

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Sondas fotoquímicas y materiales luminiscentes
para la detección de micotoxinas carboxiladas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

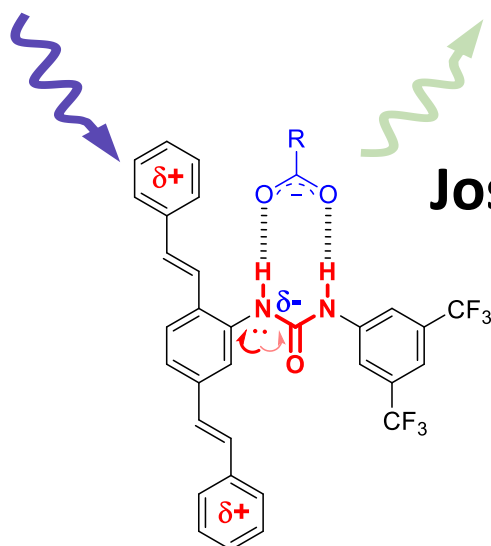
José Ángel de la Torre González

Directores

**Guillermo Orellana Moraleda
Ana Belén Descalzo López**

Madrid

SONDAS FOTOQUÍMICAS Y MATERIALES LUMINISCENTES PARA LA DETECCIÓN DE MICOTOXINAS CARBOXILADAS



Tesis doctoral

Jose Ángel de la Torre González

Directores

Guillermo Orellana Moraleda

Ana Belén Descalzo López

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Orgánica
Universidad Complutense de Madrid

2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I

TESIS DOCTORAL

**Sondas fotoquímicas y materiales luminiscentes
para la detección de micotoxinas carboxiladas**



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jose Ángel de la Torre González

Directores

Dr. Guillermo Orellana Moraleda
Dra. Ana Belén Descalzo López

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. JOSE ÁNGEL DE LA TORRE GONZÁLEZ,
estudiante en el Programa de Doctorado D9BO – DOCTORADO EN QUÍMICA ORGÁNICA,
de la Facultad de CIENCIAS QUÍMICAS de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

SONDAS FOTOQUÍMICAS Y MATERIALES LUMINISCENTES PARA LA
DETECCIÓN DE MICOTOXINAS CARBOXILADAS

y dirigida por: GUILLERMO ORELLANA MORALED A Y
ANA BELÉN DESCALZO LÓPEZ

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 15 de JULIO de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Dpto. Química Orgánica I

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.42.31
E-mail: qorgan1@ucm.es

GUILLERMO ORELLANA MORALEDA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, Y
ANA BELÉN DESCALZO LÓPEZ PROFESORA CONTRATADA DOCTORA
DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA I DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACEN CONSTAR,

Que el trabajo titulado “Sondas fotoquímicas y materiales luminiscentes para la detección de micotoxinas carboxiladas” ha sido realizado bajo su dirección en el Grupo de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA), de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, constituyendo la Tesis Doctoral de su autor, Jose Ángel de la Torre González.

Madrid, 15 de julio de 2019

Fdo: Guillermo Orellana Moraleda

Fdo: Ana Belén Descalzo López

Fdo: Jose Ángel de la Torre González

Agradecimientos

Tenía tantas ganas de escribir esta parte y ahora que me pongo, veo que es más difícil de lo que pensaba, así que para no dejarme a nadie muchas gracias a todas las personas que habéis intervenido de forma directa o indirecta, no sólo en los años que ha durado la tesis, sino en todos los años anteriores que me trajeron hasta aquí. Y ahora, vamos a ser algo más específicos.

Al Prof. Guillermo Orellana Moraleda y a la Prof. Ana Belén Descalzo, mis directores de tesis. Gracias por toda vuestra ayuda desde mucho antes de que llegase a Madrid, hasta estos últimos momentos de correcciones y papeles. Gracias por vuestros consejos y explicaciones, por todo vuestro tiempo invertido en mí y en este proyecto, muchas gracias.

A mi grupo de investigación, GSOLFA, al que después de estos cinco años ya siento como parte mía y si eso es así, ha sido por todas las personas que lo forman o que lo han formado. A la Prof. M^a Cruz Moreno Bondi que en cada reunión de grupo en las que he expuesto ha intervenido ofreciéndome su punto de vista y consejos, al Prof. Javier Urraca Ruiz, que siempre que he acudido con alguna duda me ha dedicado el tiempo necesario para resolverla ya fuese una duda científica resuelta con algún *paper* o alguna duda personal con alguna Coca-cola Zero, Javi muchas gracias, de verdad. A la Dra. Nieves Fresno gracias por todos tus consejos de síntesis y purificación, sin ellos creo que aún estaría haciendo aquella primera extracción... Al Dr. Maximino Bedoya Gutiérrez, el señor que todo lo resolvía, muchas gracias tanto por la ayuda prestada como por todos tus consejos, y como no por dejar que te acompañase al taller mecánico. A la Dra. Victoria González (la guagua) muchas gracias por tu tiempo en la lucha interminable con la asignación de más de uno y de dos picos en alguno de mis ¹H-RMNs imposibles. Al Prof. Francisco Amaro Torres, a la Prof. Elena Benito Peña, a la Dra. Pramiti Hui, al Dr. Keurison Magalhães, al Dr. Alberto *Rich* al que he enmarronado con todo el papeleo de la FPI y siempre me ha ayudado y encima con buena música de fondo, a Lidia Gomez Arribas que siempre que encontraba un *paper* que me fuese útil se acordaba de mí, a Javier Tejera Tejo, a Cristina de la Hera Hernanz, las Prof. M^a Concepción Pérez Conde y la Prof. Ana M^a Gutierrez Carrera que siempre tenían una sonrisa, al Prof. Fernando Navarro Villoslada, a Ana Bettina Glahn, Alvaro Luque Aría, Irene Agudo Canal, Andrea Guido Ielasi y a Silvia Vaghini (brava ella), a M^a del Mar Darder Amengual y como no al Dr. Luis Antoni Serrano González que me ayudó con la síntesis de ese elemento precursor que tanto se me resistió. No olvidar a la Dra. Raquel Chamorro Mendiluce y la Dra. Irene Núñez González (la cual es imposible de no querer), que cuando yo llegué ya no se encontraban en el grupo pero aun así pertenecían a la familia. A Alexandra Elbakyan por su ayuda en mis búsquedas bibliográficas. A las

secretarias del grupo, las cuales se han ganado el cielo aguantándonos a todos nosotros Nuria Martín Gavilán y Beatriz Bedoya Gutiérrez. A mis becarios que me tuvieron que sufrir, Noelia Pérez Arcos, Bagrat Abramian Petrosian y Tuğçe Kutlusoy muchas gracias por vuestras horas dedicadas a este proyecto. A todos vosotros muchas gracias.

Especialmente quiero dar las gracias a 4 miembros de GSOLFA que han estado desde el principio al final. La Dra. Francesca Salis por tu ayuda, tus consejos, tus limpiezas de aura, tus momentos divertidos, tus momentos de enfado que aunque daban mucho miedo luego hacían gracia (claro está que ninguno de esos enfados fue hacia a mi). La Dra. Riikka Peltomaa compañera de laboratorio, compañera de piso y amiga, que aunque aún sigo dudando al escribir tu nombre (no porque sea muy difícil sino que yo soy de mente difusa) tengo que darte las gracias por infinitudes de cosas: por tu ayuda en la realización del bioensayo, por tu paciencia todas las mañanas cuando yo me quedaba dormido, por nuestras clases de inglés-español con el método *translate the horóscopo...* Y como no a mi Jose Q y a mi Idoia, habéis sido la alegría del laboratorio, con los que daba gusto levantarse cada día e ir trabajar, compartir música, cervezas, paseos, fiestas y anécdotas. Me habéis ayudado muchísimo tanto en el día a día del laboratorio, como ahora con todo el papeleo que me habéis tenido que hacer en la distancia, infinidad de gracias. El trío PQM ha sido lo mejor que me llevo de la tesis, gracias Pili, Mili y Quili (L). Bueno, y a ti Idoia decirte que muchas gracias, muchas gracias por todas las llamadas que hemos compartido este año, no sabes lo que me has animado en este tedioso proceso de la escritura de la tesis, nuestras compañías telefónicas se han hecho de oro con nuestras llamadas. *Idoia, tesian izan dudan ikaskide onena zara. Elkarrekin bizi ditugun irrifarrak eta agerraldiak guzti honekin bukatzeko indarra eman didate. Eskerrik asko!*

Al Prof. Vincent de Waele y al Prof. Olivier Poizat, así como todos los miembros del grupo de investigación LASIR de la Universidad de Lille, con los que tuve el placer de aprender sobre nuevas técnicas de caracterización espectroquímica y sobre la cultura francesa, *merci beaucoup*.

Al MINECO, esta tesis forma parte de dos proyectos sin cuya ayuda económica no podrían llevarse a cabo (CTQ2012-37573-C02-01 y CTQ2015-69278-C2-2-R). También me gustaría agradecer al MINECO la concesión de una ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores (BES-2013-065252) y las ayudas a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D españoles y extranjeros (EEBB-I-17-11981), con el objetivo de obtener la Mención de Doctor Internacional.

A la Universidad Complutense de Madrid especialmente a los centro de asistencia a la investigación de Microanálisis Elemental, Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico

y Espectrometría de Masas. También al grupo de química médica de la Prof. M^a Luz López Rodríguez del departamento de química orgánica de la UCM por la amable concesión del reactor de microondas sin el cual una parte importante de la tesis no hubiera sido posible.

A Madrid que me dio el aire nuevo que necesitaba cuando mi pueblo me lo estaba quitando, *i també al meu poble, Vila-real, que em va tornar a acollir de la millor manera, quan el cel de Madrid ja no hi era tan blau i bonic.*

A mi familia Madrileña formada básicamente por Fran y Jordi, eeeeeeeellyas mis Carolines. ¿Qué habría sido de mí en Madrid sin vosotros? Seguramente una experiencia que en nada se parecería a lo que ha sido, más de 4 años llenos de anécdotas divertidas, viajes, fiestas, conversaciones transcendentales, conversaciones banales, luchas reivindicativas y orgullos. Hemos crecido juntos, hemos escupido para arriba juntos, pero lo mejor de todo es que durante este año que he estado fuera, he visto como nuestra amistad ha seguido creciendo, os habéis preocupado por mí y me habéis dado todos los ánimos posibles, así que un gran trocito de esta tesis es vuestro. Aunque tengamos millones de momentos felices juntos, siempre me quedaré con el de “Perdona cara de imbécil, ¿me puedes decir por donde se va a la plaza Santa Ana?” MARAVILLOSO. Oliver y Antonio y sus fiestas😊. También a la gente de G-Madrid, con los que no sólo he compartido momentos lúdicos, sino que gracias a ellos he podido participar en la Manifestación Estatal del Orgullo y defender los derechos de nuestro colectivo.

A todos los amigos que han soportado todas mis quejas durante todos estos años: Cabedo y Ester (mi trimonio y gran apoyo), Almu (toda la vida juntos y como parece que es poco tiempo que sean muchos más, muchas gracias por tanto...), Moni, Laura, Marco, Carmen, Godos, Marc, Cristian, Eric (sin comentarios), Jessi (J&J despeché), Salva, Cris, Mezquita, María, Ainhoa (lo que mal empieza no siempre acaba mal), Nestor y Ferran, Jose el biólogo, Vanesa, mis quimicólogos (especialmente a María con la que compartí un añito de vida Madrileña y a la que le deseo todo lo mejor y también a ti, Silvia, que desde nuestra Erasmus no hemos parado de compartir cosas), Virginia otra de las que ha tenido que sufrirme como compañero de piso, pero que sé que me tiene el mismo aprecio que yo a ella, mis amigos de la estancia Silvia, Alberto, Thomas y Jose, sino llega a ser por vosotros Francia me habría comido en una de sus *baguettes*. A mi grupo de investigación de la UJI con los que empecé en este mundo de la ciencia y fueros mis primeros mentores (Rocío, Teresa, Eva, Sonia, Pau, Iván, Rafa, Sixto, Luca, Isaac). A mi tutora del máster de profesorado, M^a José Mezquita, que no solo me facilitó enormemente el poder combinar las prácticas con la escritura de la Tesis sino que me ayudó a descubrir mi verdadera vocación y me hizo ver con ayuda de “mis primeros alumnos” lo mucho que valía como futuro profesor, espero

que el día que llegue a ser profesor lo sepa hacer con tu alegría y ganas, con tu implicación con los alumnos tanto a nivel educativo como personal, se necesitan muchos más docentes como tú y espero algún día ser uno de esos profesores que dejan huella. A Ana Carmen Salvia quien me ayudó a organizar todos mis pensamientos y temores y fue un gran impulso para esta nueva etapa.

Ya para acabar a toda mi familia, el gran apoyo de mi vida. Mis tíos Fernando y Carmen que me recibían cada vez que venía de Madrid con los brazos abiertos, por la pedazo de Paella que me preparaban siempre (ríete tú de cualquier estrella Michelin); mi abuelo Francisco, el pobre está deseando verme “colocao” pero yo me puse a hacer un doctorado con lo difícil que está la cosa, pero abuelo tranquilo que de algo encontraré faena; mis hermanos Francisco y David con los que he crecido a base de juegos y muchas peleas pero no imagino una infancia sin ellos, sé lo orgullosos que estáis de mí y os aseguro que yo de vosotros; mi padre Lázaro, que aunque es para darte de comer a parte, siempre he tenido de ti y contigo todo lo que he necesitado. Y como no, mi madre la más grande, la Fina, que como tu bien me didjiste no has escrito una sola letrita de la Tesis, pero sin ti, yo no habría podido escribir nada, así que toda la Tesis es tuya, gracias.

Aun así, seguramente me habré dejado a alguien por agradecer, así que GRACIAS, GRACIAS A TODAS, A TODOS Y A TODES.

*“Llença’t, cada instant és únic
no es repetirà,
que un llapis mai no dibuixa sense una mà.”*

Llençat, Lax'n'Busto, 2000

A mi Jordi y a la Fina

Índice

Agradecimientos	vii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	1
Notas de estilo.....	11
MOLÉCULAS SINTETIZADAS.....	13
SUMMARY	17
RESUMEN	23

Capítulo 1: Introducción

1. MICOTOXINAS	31
1.1. Métodos analítico para la determinación de micotoxinas	33
2. POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR (MIPs).....	36
3. POLÍMEROS CONJUGADOS LUMINISCENTES (CLPs).....	41
3.1. Aplicaciones de los CLPs	45
4. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	47
4.1. Aim of the research.....	49
5. BIBLIOGRAFÍA	51

Capítulo 2: Síntesis y caracterización de sucedáneos de micotoxinas y marcado fluorescente

1. OBJETIVOS	65
2. INTRODUCCIÓN. MICOTOXINAS	67
2.1. Fumonisinias	67
2.2. Citrinina.....	69
3. RESULTADOS.....	71
3.1. Síntesis del sucedáneo de la fumonisina B ₁ (Mim-FumB ₁)	71
3.1.1. Bioensayos	77
3.2. Síntesis del sucedáneo de la citrinina y marcado fluorescente.....	79
3.2.1. Caracterización óptica.....	83
4. BIBLIOGRAFÍA	86

Capítulo 3: Síntesis y caracterización de *building blocks* o elementos precursores de polímeros conjugados luminiscentes (CLPs)

1. OBJETIVOS	95
2. RECONOCIMIENTO MOLECULAR	97
2.1. Sensores químicos	98
2.2. Importancia del reconocimiento y detección de iones: ion carboxilato	99
3. ESPECTROSCOÍA DE ABSORCIÓN TRANSITORIA EN EL FEMTOSEGUNDO	100
4. RESULTADOS	106
4.1. Síntesis	106
4.1.1. Síntesis de elementos precursores para la detección de ácidos carboxílicos	106
4.1.2. Síntesis de elementos precursores para la detección del anión carboxilato	109
4.2. Caracterización por espectroscopía de absorción y fluorescencia	121
4.3. Caracterización por fluorescencia resuelta en tiempo	137
4.3.1. Caracterización espectroscópica resuelta en tiempo	138
4.3.2. Cálculos computacionales	141
4.3.3. Valoración de la respuesta óptica resuelta en el tiempo de los diferentes elementos precursores a la presencia del ion acetato	144
5. BIBLIOGRAFÍA	147

Capítulo 4: Síntesis y caracterización de polímeros conjugados luminiscentes (CLPs)

1. OBJETIVOS	157
2. POLÍMEROS CONJUGADOS LUMINISCENTES	158
2.1. Síntesis	158
2.1.1. Policondensación de Suzuki-Miyaura	162
3. RESULTADOS	165
3.1. Síntesis	165
3.2. Síntesis de monómeros	168
3.2.1. Síntesis de monómeros estructurales	168
3.2.2. Síntesis de monómeros funcionales	173
3.2.3. Síntesis de polímeros conjugados luminiscentes	174

3.3. Caracterización óptica	180
3.4. Valoración de la respuesta óptica de CLPs a la presencia de diferentes analito....	183
4. BIBLIOGRAFÍA	188

Capítulo 5: Parte experimental

1. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN	197
2. SÍNTESIS DE SUCEDÁNEOS DE MICOTOXINAS	200
2.1. Sucedáneo de la fumonisina B1.....	200
2.2. Sucedáneo de la citrinina.....	203
3. SÍNTESIS DE ELEMENTOS PRECURSORES DE CLPs	205
3.1. Elementos precursores para la detección de ácidos	205
3.2. Elementos precursores para la detección del anión carboxilato.....	208
4. SÍNTESIS DE CLPs.....	221
4.1. Síntesis de monómeros.....	221
4.2. Síntesis de polímeros	230

CONCLUSIONES	237
--------------------	-----

CONCLUSIONS	243
-------------------	-----

ANEXO I: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	249
---	-----

Sucedáneos de micotoxinas	249
---------------------------------	-----

Elementos precursores de CLPs	259
-------------------------------------	-----

Monómeros de CLPs	280
-------------------------	-----

Apéndice: Rendimiento cuántico de fluorescencia Φ_f

1. OBJETIVOS	297
2. RENDIMIENTO CUÁNTICO DE FLUORESCENCIA Φ_f	298
3. METODOLOGÍA	300
4. RESULTADOS.....	306
5. BIBLIOGRAFÍA	313

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

(<i>i</i> -Pr) ₂ NH	Diisopropilamina
ABS	Absorción
Ac ₂ O	Anhídrido acético
ACN	Acetonitrilo
AcO ⁻	Ion acetato
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AEE	Absorción del estado excitado (<i>excited state absorption, ESA</i>)
AFs	Aflatoxinas
Anh.	Anhidro
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
Ar	Anillo aromático
AVA-ASA	Trifluoroacetato de 5-((4-carboxi-3-hidroxifenil)amino)-5-oxopentan-1-amonio
BBO	Borato de bario
BDSNU	1-(2,5-di((<i>E</i>)-estiril)fenil)-3-(4-nitrofenil)urea
BDST	1-(2,5-di((<i>E</i>)-estiril)fenil)-3-feniltiourea
BDSU	1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-3-(2,5-di((<i>E</i>)-estiril)fenil)urea
BEB	2,2'-((1 <i>E</i> ,1' <i>E</i>)-(2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano)
BMSU	1-(2,5-bis((<i>E</i>)-2,5-dimetoxiestiril)fenil)-3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)urea
BODIPY	Borodipirrometano

BPSU	Tetrametil 2,2'-((1 <i>E</i> ,1' <i>E</i>)-(2-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ureido)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))ditereftalato
BSNet2	<i>N,N'</i> -(2,5-di((estiril)-1,4-fenileno)bis(metileno)bis(<i>N</i> -etiletanamina)
BSP	2,5-bis(2-feniletetil)piridina
c	Concentración
C6	Cumarina 6
C153	Cumarina 153
C102	Cumarina 102
Cat.	Catalizador
CCD	Dispositivo de carga acoplada (<i>charge-coupled device</i>)
CCF	Cromatografía en capa fina
CE	Comunidad Europea
CIP	Polímero de control con impronta [molecular] (<i>control imprinted polymer</i>)
CLP	Polímero conjugado luminiscente (<i>conjugated luminescent polymer</i>)
Cp	Ciclopentadienilo
CV	Perclorato de violeta de cresilo
CT	Citrinina
d	Doblete
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
dBrB	1,4-dibromo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DCM _{dye}	4-(dicianometileno)-2-metil-6-(4-dimetilaminostiril)-4 <i>H</i> -pirano
DCU	Diciclohexilurea
dd	Doblete de dobletes

DEF	Decoloración del estado fundamental (<i>ground state bleaching</i> , GSB)
DFT	Teoría del funcional de la densidad (<i>density functional theory</i>)
dIB	1,4-diiodo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno
DMA	2,5-bis((<i>E</i>)-2,5-dimetoxiestiril)anilina
DMF	Dimetilformamida
DMPET	Transferencia de energía de partículas de dipolo a metal (<i>dipole-to-metal particle energy transfer</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Tetrametil 2,2'-((1 <i>E</i> ,1' <i>E</i>)-(2-amino-1,4-fenilen)bis(eteno-2,1-diil)) ditereftalato
9,10-DPA	9,10-difenilantraceno
DSA	2,5-di((<i>E</i>)-estiril)anilina
DSB	1,4-diestirilbenceno
dt	Doblete de tripletes
DVA	2,5-Divinilanilina
DVB	Divinilbenceno
ϵ	Coefficiente de absorción molar [$\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
EE	Emisión estimulada (<i>stimulated emission</i> , SE)
EFSA	Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (<i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)
EM	Emisión
ErB	Eritrosina B
ESI	Ionización por electropulverización (<i>electrospray ionization</i>)
ESPT	Transferencia de protón en el estado excitado (<i>excited state proton transfer</i>)
EXC	Excitación

FA ₁	Fumonisin A ₁
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization)
FB ₁	Fumonisin B ₁
FBs	Fumonisin B
FC ₁	Fumonisin C ₁
Φ_f	Rendimiento cuántico de fluorescencia
FL	Fluorescencia
FLC	Fluoresceína
FLIM	Microscopía de imagen por tiempo de vida de fluorescencia (<i>fluorescence-lifetime imaging microscopy</i>)
FP ₁	Fumonisin P ₁
FRET	Transferencia de energía de resonancia Förster (<i>Förster resonance energy transfer</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>gas chromatography</i>)
GPC	Cromatografía de permeación en gel (<i>gel permeation chromatography</i>)
HATU	Hexafluorofosfato de azabenzotriazol tetrametiluronio
$h\nu$	Fotón
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de altas prestaciones (<i>high performance liquid chromatography</i>)
I	Intensidad de luminiscencia
IAC	Columnas de Inmunoafinidad (<i>immunoaffinity columns</i>)
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ICT	Trasferencia de carga intramolecular (<i>intramolecular charge transfer</i>)

IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
J	Constante de acoplamiento
K	Constante de enlace
LC	Cromatografía líquida (<i>liquid chromatography</i>)
LLE	Extracción líquido-líquido [con agitación] (<i>liquid-liquid extraction</i>)
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MALDI	Ionización por desorción con láser asistida por la matriz (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MBDPY	Monómero BODIPY dibromado: 1.11. 2,6-dibromo-8-fenil-1,3,5,7-tetrametil-4,4'-difluoroboradiazaindaceno
MdIP	2,4-diiodopiridina
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida (<i>matrix solid phase dispersión</i>)
Mim-FumB ₁	Ácido 2,2'-((etano-1,2-diilbis(etilazanedil))bis(2-oxoetano-2,1-diol))disuccínico
MIP	Polímero con impronta molecular (<i>molecularly imprinted polymer</i>)
MMTP	Mimotopo
M _n	Peso molecular promedio en número [del polímero]
MNEt ₂	<i>N,N'</i> -((2,5-dibromo-1,4-fenilen)bis(metilen))bis(<i>N</i> -etiletanamina)
MS	Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>)
MU	Monómero [derivado de la] urea, 1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-3-(2,5-dibromofenil)urea
MW	Microondas
NarPer	Naranja de perileno
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NIP	Polímero sin impronta [molecular] (<i>non-imprinted polymer</i>)

NOPA	Amplificador óptico paramétrico no colineal (<i>noncollinear optical parametric amplifier</i>)
NP	Nanopartícula
NPAu	Nanopartícula de oro
NSET	Transferencia de energía de superficie del nanometal (<i>nanometal surface energy transfer</i>)
OLED	Diodo emisor de luz orgánico (<i>organic light-emitting diode</i>)
OPA	Amplificador óptico paramétrico (<i>optical parametric amplifier</i>)
OTA	Ocratoxina A
Ox1	Perclorato de oxazina
Ox170	Perclorato de oxazina 170
p/v	Relación peso/volumen
PAT	Patulina
PC	Polímero conjugado
PCLIM	Polímero conjugado luminiscente con impronta molecular
PET	Transferencia electrónica fotoinducida (<i>photoinduced electron transfer</i>)
PPO	2,5-difeniloxazol
PTP	<i>p</i> -terfenilo
q	cuadruplete
QD	Dicación quinina
RAFT	Transferencia de cadena con adición/fragmentación reversible (<i>reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization</i>)
R101	Rodamina 101
R6G	Rodamina 6G
RMN	Resonancia magnética nuclear
RojPer	Rojo de perileno

Ru(bpy) ₃	Dihexafluorofosfato de tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II)
s	Singlete
s.a.	Singlete ancho
S ₀	Estado fundamental singlete
S ₁	Primer estado excitado singlete
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>scanning electron microscopy</i>)
SET	Transferencia de energía de superficie (<i>surface energy transfer</i>)
SHG	Generador del segundo armónico (<i>second-harmonic generation</i>)
SLE	Extracción sólido-líquido [con agitación] (<i>solid-liquid extraction</i>)
S _N 1	Sustitución nucleofílica unimolecular
S _N 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
SPE	Extracción en fase sólida (<i>solid-phase extraction</i>)
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>solid-phase microextraction</i>)
SPT	Cronometraje de fotones individuales (<i>single-photon timing</i>)
T	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
T ₁	Primer estado excitado triplete
TBBF	Sal de tetrabutilamonio de la BOC-L-fenilalanina
TBHB	Sal de tetrabutilamonio del ácido salicílico
tBrB	1,3,5-tribromobenceno
TCs	Tricotecenos
TD-DFT	Teoría del funcional de la densidad tiempo-dependiente (<i>time-dependent density functional theory</i>)
TEM	Microscopio electrónico de transmisión (<i>transmission electron microscopy</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético

THF	Tetrahidrofurano
THG	Generador del tercer armónico (<i>third-harmonic generation</i>)
Ti:Sa	Láser de titanio:zafiro
tIB	1,3,5-triyodobenceno
TNT	Trinitrotolueno
TOF	Tiempo de vuelo (<i>time-of-flight</i>)
TsOR	2-(2-metoxietoxi)etil 4-metilbencenosulfonato
UE	Unión Europea
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
v/v	Relación volumen/volumen
YFP	Proteína fluorescente en el amarillo (<i>yellow fluorescent protein</i>)
ZnPTC	Ftalocianina de zinc (II)
ZnTPP	Tetrafenilporfirina de zinc (II)
ZON	Zearalenona
ZrCp ₂ HCl	[Cloridobis(η^5 -ciclopentadienil)hidrido]zirconio(IV) (reactivo de Schwartz)
ΔA	Absorción
δ	Desplazamiento químico (en ppm)
λ	Longitud de onda/nm
τ	Tiempo de vida de luminiscencia

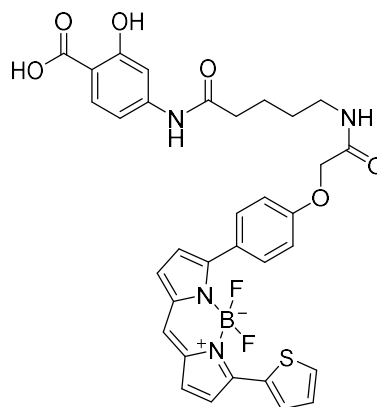
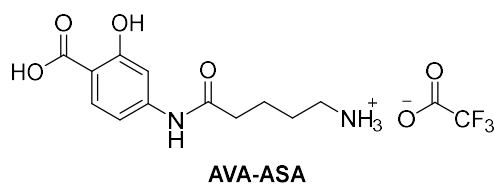
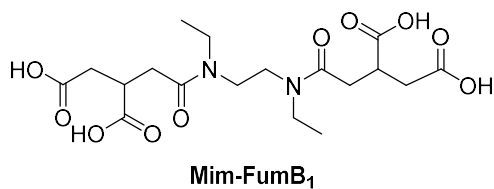
Notas de estilo

1. Con objeto de homogenizar el criterio de nomenclatura a lo largo de la presente Tesis Doctoral, los decimales no se indican con comas, sino con puntos.
2. Las referencias bibliográficas, gestionadas con el programa EndNote (v. X8.2, Thomson Reuters), se muestran en formato de la revista *Chemical Science*, de la Royal Society of Chemistry.

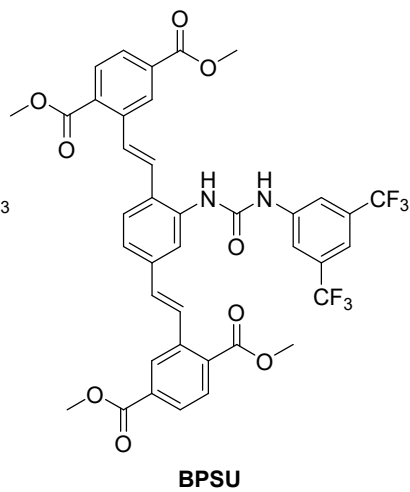
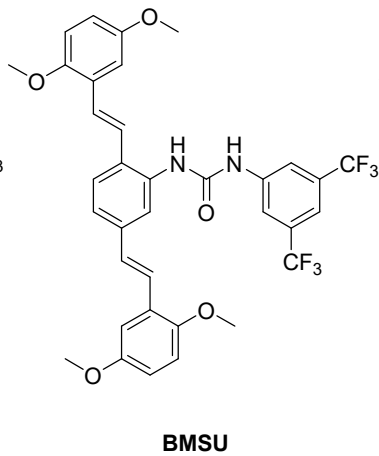
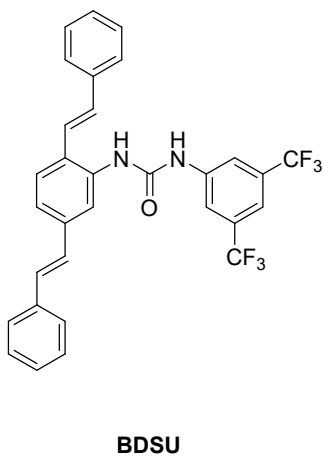
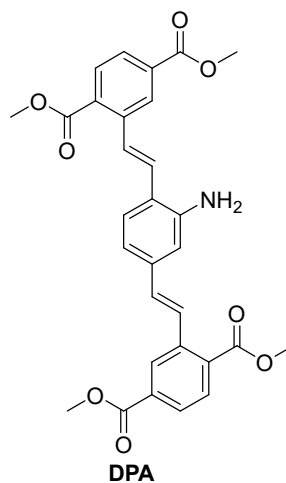
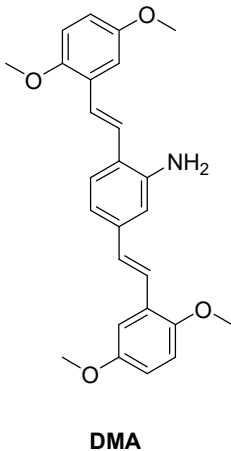
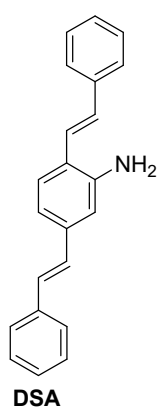
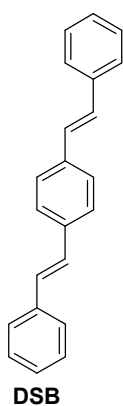
MOLÉCULAS SINTETIZADAS

Para facilitar la discusión de resultados, se muestran las estructuras de las moléculas finales sintetizadas, agrupadas por capítulos.

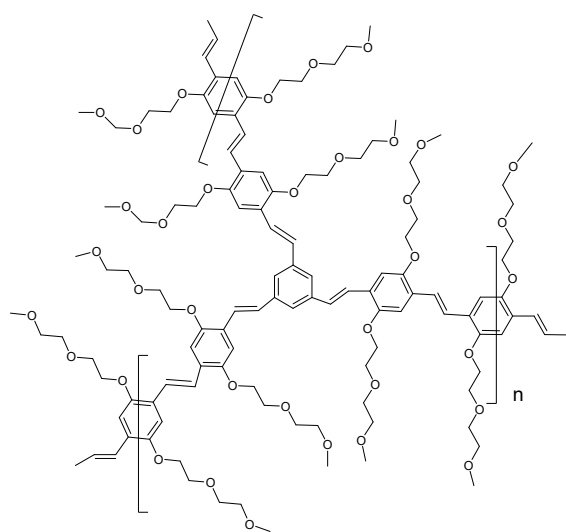
Capítulo 2:



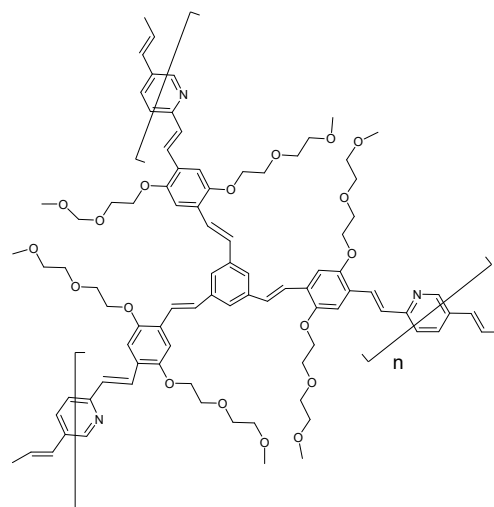
Capítulo 3:



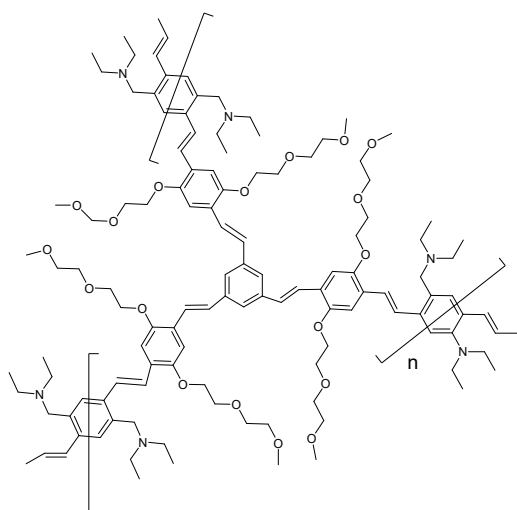
Capítulo 4:



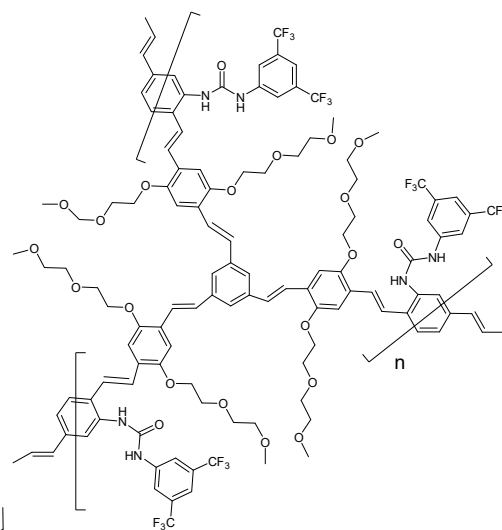
PCL1



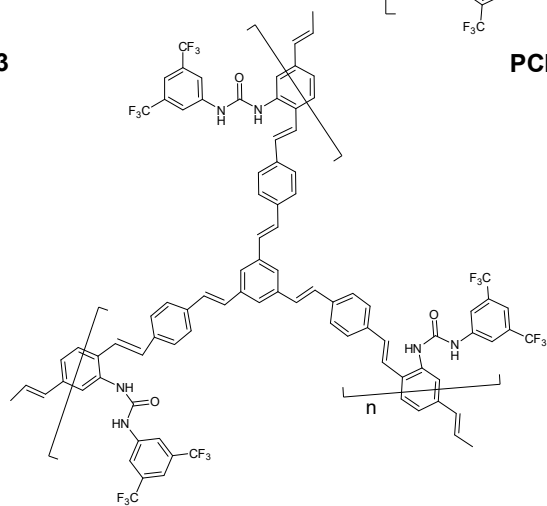
PCL2



PCL3



PCL4



PCL5

SUMMARY

In recent years, food safety has become a growing concern, not only for the public authorities and producers of the food sector, but also for the society. Chemical contaminants that are considered to be dangerous include some types of mycotoxins which are natural products, produced as secondary metabolites by filamentous fungi. These low molecular weight compounds (around 700 g/mol) are highly ionisable and therefore very reactive. They can react with different molecules of eukaryotic cells and cause harmful effects on the human health (infertility, birth defects, damage of the immune system, brain injuries, etc.).

The growing need for new analytical methods with food safety applications has accelerated the development of sophisticated and sensitive methods to detect common food contaminants. In particular, owing to their many appealing characteristics, chemical sensors have become an attractive alternative to the chromatographic methods that require large and expensive equipment, as well as specialized personnel. The main goal of this thesis was to develop new chemical sensors that satisfy the sensitivity and selectivity requirements necessary for mycotoxin determination in food. For that reason two different fields are combined, on the one hand molecularly imprinted polymers (MIPs) and, on the other, conjugated luminescent polymers (CLPs).

Among the different types of materials used for the selective molecular recognition of the analytes of interest, MIPs have gained particular attention owing to their ease of preparation and high stability. To obtain MIPs, a polymerization is carried out around a molecule that acts as a template. Firstly, the template is put in contact with the functional monomer(s), so that a complex of the template and monomer(s) is formed by reversible interactions (covalent or non-covalent). Next, a polymerization occurs around the template molecule, leaving it trapped. Once the polymerization is completed, the template molecule is thoroughly extracted leaving behind three-dimensional cavities responsible for the molecular recognition of the polymer structure, since they are complementary in size, shape and functional groups, to the target analyte.

The synthesis of MIPs usually requires significant amounts of the template molecule, so that often the use of the template molecule can be limited by its high cost or toxicity. To circumvent these limitations, the template molecule can be replaced by a mimic (or “surrogate”), which is a molecule similar to the analyte of interest in terms of the critical functional groups and their arrangement.

In chapter 2 ("Synthesis and characterization of mycotoxin mimics and fluorescent labelling"), we have successfully synthesized a molecule (**Mim-FumB₁**) that can act as a mimic for the

mycotoxin fumonisin B₁. This molecule imitates the four carboxylic groups present in the natural fumonisin B₁ mycotoxin, the presence of which is considered essential for the recognition by antibodies.

To obtain **Mim-FumB₁**, the starting material was the tricarballic acid, a commercially available inexpensive molecule, on which an intramolecular cyclization was carried out leaving only one of the three acid groups free. With the help of thionyl chloride the formation of the acyl chloride of the acid was carried out. Then, the acid chloride was made to react with *N,N'*-diethyl-1,2-ethanediamine and, finally, the opening of the ring was carried out in basic medium, obtaining the desired molecule in 4 steps and a total yield of almost 50 %.

To evaluate the potential of **Mim-FumB₁** as a mimic for fumonisin B₁, a competitive fluorescence deactivation immunoassay was carried out, from which it could be concluded that the mimic was efficiently recognized by fumonisin-specific antibodies. The quantities necessary for the recognition of the mimic by the antibodies were 3 orders of magnitude higher than those of the natural mycotoxin, but it is impossible to compete with the antigen–antibody recognition itself. The results can be considered very promising and confirm the suitability of the surrogate chosen in this thesis to mimic fumonisin B₁ as a template in the synthesis of the corresponding MIPs.

In the second part of this chapter, a mimic for the citrinin mycotoxin was prepared from 4-aminosalicylic acid. Firstly, an amidation was carried out to obtain the **AVA-ASA** derivative for its application in the preparation of MIPs in nanogel format, for which the covalent coupling of the template molecule on silanized glass microspheres is essential. We decided to introduce a spacer of at least 5 carbon atoms so that the template was sufficiently separated from the surface of the glass and thus would allow the creation of cavities in the MIP. Much longer spacers are not convenient since the carbon chain might fold on itself. Furthermore, in order to use the **AVA-ASA** as a probe in competitive fluorescence assays, the molecule was derivatized with a commercial dye, a BODIPY, displaying a very intense fluorescence. The **BODIPY-AVA-ASA** molecule was optically characterized noticing that neither the fluorescence intensity nor the absorption maximum of the commercial BODIPY label were affected by its coupling to **AVA-ASA**. Moreover, fluorescence quantum yields close to 1 in organic solvents were measured.

In chapter 3 ("Synthesis and characterization of building blocks of conjugated luminescent polymers (CLPs)"), the synthesis of new fluorescent receptor analogues of 1,4-distyrylbenzene (**DSB**) was addressed, with the goal of developing conjugated luminescent polymers (CLPs) for new sensors of higher sensitivity than non-conjugated polymers or molecular fluorescent

probes, thanks to the luminescent signal amplification in the recognition and detection event of the target analytes.

DSB imitates the building blocks of the conjugated polymer chains, and different modifications were made to it. On the one hand, the central aromatic ring was substituted with different receptor groups (pyridines, amines, ureas and thioureas) capable of interacting with the analytes of interest and, on the other, substituents with different electronic characteristics were introduced in the terminal aromatic ring, to study their influence on the photochemical response.

For the first approach, basic units were inserted in the central ring to obtain an acid-base interaction for the recognition of the carboxylic acids of the analytes by the receptor moiety. Two receptors were synthesized: one that had a tertiary amine not conjugated with the vinylbenzene chain (**BSNet2**) and another based on the presence of a pyridine (**BSP**) in the central ring. Their response was evaluated against a strong acid, **TFA**. The first one did not present any response, while the second one showed a very weak response. Due to the small response from these CLP precursors, a new approach was proposed based on the urea-carboxylate interaction.

Three urea receptors based also on the structure of the **DSB** were synthesized. The urea group was placed in the central benzene ring while, in the terminal benzene rings, substituents with different electronic characteristics were added to study their effect on the photochemical response: **BMSU** (endowed with electron-donating groups), **BDSU** (without any substituent) and **BPSU** (with electron-withdrawing groups). After the spectroscopic characterization, the response of the molecules to different anions was assessed. Firstly, the **urea-acetate** interaction was evaluated and compared with the **urea-fluoride** response. Additionally, the response against different carboxylated molecules that could be used as mimics of different mycotoxins, was also studied.

After the spectroscopic characterization and the different titrations, we could conclude that the presence of electron-withdrawing groups favours the intramolecular charge transfer in the excited state, which is thought to be responsible for the deactivation of their fluorescence. The **BPSU** urea displayed the highest response, because the electron-accepting groups increased the acidity of the receptor, facilitating the **urea-acetate** interaction. For the **BDSU** urea, the appearance of a new and unstructured broad emission band at higher wavelengths was observed, which was attributed to a proton transfer process in the excited state. These phenomena were studied in depth using transient absorption spectroscopy with femtosecond

laser excitation during a research stage in the University of Lille (France), in the group of Prof. Olivier Poizat.

In the last chapter, (4 "Synthesis and characterization of conjugated luminescent polymers (CLPs)"), the synthesis and characterization of cross-linked CLPs for their possible application in the field of chemical sensors were carried out. Additionally, their optical response against the same analytes as their homologous precursor building blocks was evaluated in order to compare the response of polymer and repeating unit, and to study whether signal amplification could be achieved. Unfortunately, the results were not conclusive. A total of 6 CLPs were synthesized:

- **CLP1**, devoid of any type of receptor, was used as a reference.
- **CLP2**, with pyridine units for detection of organic acids through the protonation of the pyridine nitrogen. A substantial improvement was observed with respect to its molecular analogue, **BSP**.
- **CLP3**, with non-conjugated tertiary amines in the side chains of the polymer for recognition of organic acids through the inhibition of a possible PET process. No response was observed, neither for **CLP3** nor for its analogue, **BSNet2**.
- **CLP4**, with urea groups for the detection of carboxylated molecules through double hydrogen bonding. The polymer has alkoxy side chains and its molecular building block is the **BMSU**. The polymer, unlike **BMSU**, showed a response in the presence of the acetate ion and a slight improvement in the presence of fluoride.
- **CLP5**, with urea groups for the detection of carboxylated molecules through hydrogen bonding. In contrast to **CLP4**, **CLP5** does not have alkoxylate side chains and its response was quite similar or slightly lower than its building block, **BDSU**. Unlike **BDSU**, the broadband at 620 nm (attributed to an ESPT process) was not observed in **CLP5**. This might be due to the fact that in the hydrophobic environment of the polymer, the formation of a polar excited state generated by proton transfer is not favoured.
- **CLP6**, also with urea groups for detecting carboxylated molecules through hydrogen bonding. In addition, BODIPY units were incorporated to displace the absorption and emission of the CLP at longer wavelengths. Unfortunately, the polymer turned out to be non-luminescent.

We observed that the changes in the response (diminution of the emission intensity) of all the CLPs were quite abrupt, which might be due to problems of diffusion of the acetate or fluoride ions within the polymer network. The synthesized bulk polymer showed little porosity, which can severely hinder the diffusion of the analytes. This drawback might be improved in the future by preparing polymers in other formats, such as nanospheres, core-shell particles or nanofilms.

Additionally, the results obtained in an IUPAC project consisting of an interlaboratory determination and comparison of fluorescence quantum yields for a list of 20 fluorophores, covering a spectral range from 200 nm to 800 nm, are presented in the Appendix. The project aims were: 1) to investigate the reproducibility and interlaboratory variability of "routine" Φ_f

measurements using absolute and relative methods and 2) to provide an extended set of standards for Φ_f measurements with the relative method.

RESUMEN

En los últimos años la seguridad alimentaria se ha convertido en una preocupación creciente, no sólo para los poderes públicos y productores del sector alimentario, sino también para el conjunto de la sociedad. Entre los contaminantes químicos de los alimentos considerados como peligrosos se incluyen algunos tipos de micotoxinas. Pese a la gran diversidad química estructural que presenta este tipo de compuestos, las micotoxinas son productos naturales, generados como metabolitos secundarios por hongos filamentosos, cuyo peso molecular se encuentra alrededor de los 700 g/mol. Son altamente ionizables y, por ello, muy reactivos; al reaccionar con distintas dianas de las células eucariotas dan lugar a efectos nocivos para la salud humana, influyendo en la tasa creciente de enfermedades crónicas como infertilidad, defectos de nacimiento, deterioro del sistema inmunológico, lesiones cerebrales, etc.

Paralelamente a la preocupación por la toxicidad en los alimentos, las técnicas analíticas han experimentado un gran avance y, con ellas, la tecnología de sensores químicos está alcanzando un extraordinario grado de sofisticación como alternativa a los métodos cromatográficos que requieren grandes y costosos equipos, así como personal especializado. Con el fin de desarrollar nuevos sensores químicos con la sensibilidad y selectividad necesarias para la determinación de micotoxinas en alimentos, se plantea la presente Tesis, la cual trata de combinar por un lado el campo de los polímeros con impronta molecular (MIPs) y, por otro, el de los polímeros conjugados luminiscentes (CLPs).

Entre los diferentes tipos de materiales empleados para el reconocimiento molecular selectivo de los analitos de interés, se encuentran los polímeros de impronta molecular. Para la obtención de MIPs, se realiza una polimerización alrededor de una molécula que actúa como plantilla. Para ello, en primer lugar, la plantilla se pone en contacto con el/los monómero/s funcional/es seleccionados, de manera que se forma un complejo molécula plantilla-monómero/s mediante interacciones reversibles de tipo covalente o no covalente. A continuación, se produce la polimerización alrededor de la molécula plantilla, quedando ésta atrapada. Una vez finalizada la polimerización la molécula plantilla se extrae cuidadosamente, dejando en la estructura del polímero unas cavidades tridimensionales responsables del reconocimiento molecular gracias a que son complementarias en tamaño, forma y grupos funcionales al analito de interés.

A la hora de llevar a cabo la síntesis de MIPs, se emplean cantidades relativamente grandes de la molécula plantilla. Generalmente, el uso de la molécula plantilla está limitado por su alto coste económico, además de por su toxicidad. Para evitar estos inconvenientes, se suelen emplear

moléculas análogas, en cuanto a forma y grupos funcionales, al analito de interés, las cuales reciben el nombre de mímicos o sucedáneos.

En el capítulo 2 de la presente Tesis (“Síntesis y caracterización de sucedáneos de micotoxinas y marcado fluorescente”), se aborda de forma satisfactoria la síntesis de una molécula (**Mim-FumB₁**) que puede actuar como sucedáneo de la micotoxina fumonisina B₁. En dicha molécula se imita la disposición de los cuatro grupos carboxílicos presentes en la micotoxina natural, cuya presencia se considera que es fundamental para el reconocimiento por anticuerpos.

Para la obtención del sucedáneo propuesto se partió del ácido tricarbálico, molécula de bajo coste disponible comercialmente, sobre la cual se llevó a cabo una ciclación intramolecular dejando libre únicamente uno de los tres grupos carboxílicos. Con ayuda del cloruro de tionilo se llevó a cabo la formación del cloruro de acilo correspondiente. Finalmente, el cloruro de alcanilo se hizo reaccionar con la *N,N'*-dietil-1,2-etanodiamina para, a continuación, llevar a cabo la apertura de los heterociclos en medio básico, obteniendo así la molécula deseada en 4 pasos y un rendimiento global de casi el 50 %.

Para comprobar el potencial de la **Mim-FumB₁** como sucedáneo de fumonisina B₁ se llevó a cabo un inmunoensayo competitivo de desactivación de fluorescencia, en el que se pudo concluir que el sucedáneo era reconocido de forma efectiva por anticuerpos específicos de fumonisina. Las cantidades necesarias para el reconocimiento del sucedáneo por parte de los anticuerpos fueron superiores a las de la micotoxina natural, pero es imposible competir con el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Se trata de unos resultados muy prometedores que confirman la idoneidad del candidato elegido en esta Tesis para imitar a la fumonisina B₁ como plantilla en la síntesis de MIPs.

En la segunda parte de este capítulo se abordó la preparación de análogos de citrinina partiendo del ácido 4-aminosalicílico. En primer lugar, se llevó a cabo una reacción de amidación para la obtención del derivado **AVA-ASA**, con el fin de llevar a cabo su aplicación en la elaboración de MIPs en formato nanogel, para lo que es necesario el anclaje covalente de la molécula plantilla sobre microesferas de vidrio silanizadas. Se optó así por introducir un espaciador de al menos 5 átomos de carbono, para que la plantilla quedase suficientemente separada de la superficie del vidrio y permitiera así la creación de cavidades en el MIP. Espaciadores mucho más largos tampoco son convenientes, ya que la cadena carbonada podría plegarse sobre sí misma. Además, la molécula **AVA-ASA** se derivatizó con un colorante comercial intensamente fluorescente tipo BODIPY, para su empleo como etiqueta en ensayos competitivos de fluorescencia. La molécula **BODIPY-AVA-ASA** se caracterizó espectroscópicamente y se observó

que ni la fluorescencia, ni el máximo de absorción del BODIPY comercial, se veían afectados tras el acoplamiento con **AVA-ASA**, y que los valores de rendimiento cuántico de fluorescencia, cercanos al 100 % en disolventes orgánicos, se mantenían.

En el capítulo 3 (“Síntesis y caracterización de building blocks o elementos precursores de polímeros conjugados fluorescentes (CLPs)”) se abordó la síntesis de nuevos receptores fluorescentes análogos al 1,4-diestirilbenceno (**DSB**), con el objetivo final de desarrollar CLPs para el fabricar nuevos materiales de mayor sensibilidad que las sondas moleculares fluorescentes o los polímeros no conjugados, gracias a la amplificación de la señal luminiscente en el proceso de reconocimiento y detección de analitos de interés.

La estructura del **DSB** imita los bloques de construcción de las cadenas poliméricas conjugadas, y, sobre ésta, se realizaron diferentes modificaciones. Por un lado, la sustitución del anillo aromático central por otros dotados de grupos receptores (piridinas, aminas, ureas y tioureas) capaces de interacciona con los diferentes analitos de interés y, por otro, la incorporación de sustituyentes en los anillos aromáticos terminales con diferentes características electrodonadoras para estudiar la influencia de estos en la respuesta fotoquímica.

En una primera aproximación, se insertaron unidades básicas en el anillo central, para propiciar una interacción ácido-base encargada del reconocimiento molecular de los ácidos carboxílicos de los analitos de interés, por el receptor. Así, se sintetizaron dos receptores, uno que poseía una amina terciaria no conjugada con la cadena bencílica (**BSNet2**) y otro basado en la presencia de una piridina (**BSP**) en el anillo central. Se valoraron sus respuestas frente a un ácido fuerte como el **TFA**. El primero no respondió, mientras que la respuesta del segundo fue muy baja. A la vista de la escasa o nula variación de la señal luminiscente de estos precursores de CLPs, se planteó una nueva aproximación basada en la interacción urea-carboxilato.

Se sintetizaron tres receptores urea basados también en la estructura del **DSB**. La urea se situó en el benceno central, mientras que en los bencenos terminales se añadieron sustituyentes con características electrónicas diferentes para estudiar la influencia que tenían estas en la respuesta fotoquímica: **BMSU** (con grupos dadores de electrones), **BDSU** (sin ningún sustituyente) y **BPSU** (con grupos aceptores de electrones).

Una vez caracterizados los diferentes elementos precursores de CLPs basados en ureas fluorescentes, se procedió a examinar la respuesta de estos frente a diferentes aniones. En primer lugar se valoró la interacción **urea-acetato** y se comparó con la respuesta **urea-fluoruro**, observando una mayor afinidad de los receptores por el ion acetato. Finalmente también se

estudió la respuesta a diferentes moléculas carboxiladas y que podían considerarse sucedáneos de diferentes micotoxinas.

Gracias a la caracterización fotofísica y a las diferentes valoraciones, se concluyó que la presencia de grupos aceptores de electrones favorecía el proceso de transferencia de carga en el estado excitado (PET), el cual consideramos responsable del proceso de desactivación de la fluorescencia. La urea **BPSU** fue la que mayor respuesta mostró; los grupos aceptores de electrones aumentan la acidez del receptor y, por tanto, la interacción **urea-acetato** se ve favorecida. Para la urea **BDSU** se observó la aparición de una nueva banda ancha y desestructurada a longitudes de onda mayores que se atribuyó a un proceso de transferencia de protón en el estado excitado (ESPT). Estos procesos se investigaron en profundidad a través de la espectroscopia de absorción transitoria con excitación por láser de femtosegundo, los cuales se llevaron a cabo durante una estancia predoctoral en la Universidad de Lille (Francia) en el grupo del Prof. Poizat.

En el último capítulo (4 “Síntesis y caracterización de polímeros conjugados fluorescentes (CLPs)”), se procedió a la síntesis y caracterización de CLPs entrecruzados para su posible aplicación en el campo de los sensores químicos ópticos, además de la valoración de su respuesta óptica frente a los mismos analitos que sus elementos precursores homólogos. Con ello se pretendía poder comparar la respuesta de ambos y confirmar o no el efecto de la amplificación de la señal de la respuesta fotoquímica producida por la interacción analito-receptor. Desgraciadamente, los resultados no fueron concluyentes. Se sintetizaron un total de 6 CLPs:

- **CLP1**: no contenía ningún tipo de receptor, y se empleó como referencia.
- **CLP2**: con unidades de piridina para la detección de ácidos orgánicos a través de la protonación (o enlaces de hidrógeno) del nitrógeno heterocíclico. Se observó una mejora sustancial respecto a su homólogo molecular, el **BSP**.
- **CLP3**: con aminas terciarias no conjugadas en las cadenas laterales, para la detección de ácidos orgánicos a través de la inhibición de un posible proceso PET. Al igual que su homólogo molecular, el **BSNet2**, no mostró respuesta alguna.
- **CLP4**: con grupos urea para la detección de moléculas carboxiladas a través de enlaces de hidrógeno. El polímero posee cadenas laterales alcoxídicas. Su homólogo molecular es el **BMSU**. El polímero, a diferencia de su homólogo molecular, sí respondió a la presencia del ion acetato y presentó una ligera mejora en la respuesta al fluoruro.
- **CLP5**: con grupos urea para la detección de moléculas carboxiladas a través de enlaces de hidrógeno. A diferencia del **CLP4**, no posee cadenas laterales alcoxídicas. Presentó una respuesta bastante similar o algo inferior a la de su entidad repetitiva, el **BDSU**. A diferencia de ésta, el **CLP5** no muestra la banda ancha a ca. 620 nm (atribuida a un proceso ESPT). Esto puede ser debido al hecho que en el entorno hidrofóbico del

polímero no se ve favorecida la formación de un estado excitado tan polar como el que se genera por una transferencia protónica.

- **CLP6:** con grupos urea para la detección de moléculas carboxiladas a través de enlaces de hidrógeno. Además, se incorporaron unidades BODIPY para desplazar la absorción y la emisión del CLP a longitudes de onda mayores. Lamentablemente, el polímero resultó no ser fluorescente.

Se observó que los cambios en la respuesta (disminución de la intensidad en los espectros de emisión) de todos los CLPs eran bastante bruscos, lo que puede deberse a un problema de difusión del acetato o fluoruro al interior de la red del polímero. Se trata de polímeros muy poco porosos, donde la cinética de intercambio puede ser lenta. Esto se mejoraría con la síntesis de polímeros en otro tipo de formatos como nanoesferas, partículas núcleo-recubrimiento o nanopelículas, siendo esto una posible área de trabajo futura.

De forma adicional, en el Apéndice se presentan los resultados obtenidos en un proyecto de la IUPAC consistente en la determinación y comparación interlaboratorio de los valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia de 20 fluoróforos seleccionados, que abarcan un rango espectral que va desde los 200 nm a los 800 nm. Los principales objetivos consistían en la obtención de información sobre la reproducibilidad y la variabilidad entre laboratorios de las mediciones de Φ_f "de rutina" utilizando métodos absolutos y relativos y la ampliación de la oferta de estándares para la medición de Φ_f por el método relativo.

Capítulo 1: Introducción

1.	MICOTOXINAS	31
1.1.	Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas	33
2.	POLÍMEROS CON IMPRONTA MOLECULAR (MIPs)	36
3.	POLÍMEROS CONJUGADOS LUMINISCENTES (CLPs)	41
3.1.	Aplicaciones de los CLPs.....	45
4.	OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	47
4.1.	Aim of the research.....	49
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

1. MICOTOXINAS

La palabra "micotoxina" tiene su origen etimológico en la combinación de las palabras griegas "mykes", que significa hongo, y la palabra latina "toxicum", que significa veneno. Así, en 1996 el Prof. Pitt¹ definió las micotoxinas como:

"...metabolitos de los hongos que, al ingerirse, inhalarse o absorberse por la piel reducen la actividad, producen enfermedad o la muerte en el hombre y los animales".

Pese a la gran diversidad química estructural que presentan este tipo de compuestos, de forma general, las micotoxinas son productos naturales, producidos como metabolitos secundarios por hongos filamentosos,² cuyo peso molecular se encuentra alrededor de los 700 g/mol. . Son altamente ionizables y, por ello, muy reactivos; al reaccionar con distintas dianas de las células eucariotas dan lugar a efectos nocivos para la salud humana, influyendo en la tasa creciente de enfermedades crónicas como infertilidad, defectos de nacimiento, deterioro del sistema inmunológico, lesiones cerebrales, etc.³⁻⁴ Estas pueden encontrarse como contaminantes en productos vegetales, en cereales, especias, incluso en productos de origen animal como leche y huevos.³

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) se estima que el 25 % de los cultivos del mundo están afectados por micotoxinas. Los costes económicos derivados de esta contaminación son imposibles de determinar con precisión,⁵⁻⁶ pero afectan especialmente a la Unión Europea (UE), que es a nivel mundial el mayor productor de productos alimentarios y bebidas (un 15 % de la producción industrial total). No es de extrañar que la seguridad alimentaria se haya convertido en una preocupación creciente. Las pérdidas derivadas de la presencia de micotoxinas en productos agrícolas en los países industrializados son fundamentalmente económicas pero, en países en desarrollo, a estas pérdidas hay que sumar importantes consecuencias sobre la salud. La exposición continua a niveles elevados de micotoxinas, a menudo combinada con la malnutrición, causa diferentes niveles de toxicosis e incluso la muerte.⁷

Existen más de 10000 especies conocidas de hongos, de las cuales cerca de 50 son capaces de producir micotoxinas, siendo los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* los más importantes.⁸ En la **Figura 1** se muestran las estructuras de las micotoxinas más estudiadas por sus efectos adversos sobre la salud humana y animal. Estas son la familia de las aflatoxinas (AFs), la citrinina (CT), las fumonisinas (FBs), la ocratoxina A (OTA), la patulina (PAT), los tricotecenos (TCs), y la zearalenona (ZON).⁹ En la **Tabla 1** se detallan los hongos que las producen, los principales alimentos donde se pueden encontrar y sus efectos tóxicos más representativos.

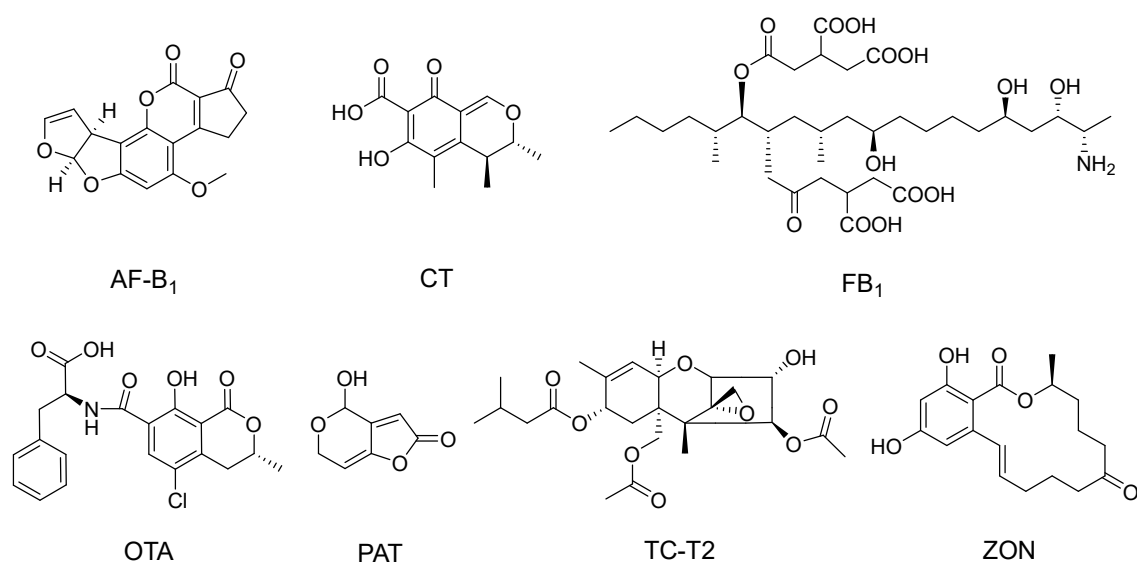


Figura 1. Estructura de las principales micotoxinas estudiadas en seguridad alimentaria.

Tabla 1. Principales micotoxinas, hongos productores, alimentos principales donde se encuentran y efectos tóxicos más representativos.^{2-3, 10-11}

MICOTOXINA	HONGO	SUSTRATO PRINCIPAL	PRINCIPALES EFECTOS TÓXICOS
AFLATOXINAS	<i>Aspergillus</i>	Cereales, leche, frutos secos	Altamente cancerígena, produce toxicidad y cáncer de hígado
CITRININA	<i>Penicillium</i>	Cereales y frutas	Efecto nefrotóxico, inmunosupresora
FUMONISINAS	<i>Fusarium</i> <i>A. Niger</i>	Cereales (maíz)	Carcinógena, hepatotóxica
OCRATOXINAS	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Cereales, café, legumbres, quesos, carnes ahumadas, frutas	Efecto nefrotóxico, necrosis hepática, inmunosupresora
PATULINA	<i>Penicillium</i>	Cereales, frutas, quesos	Neurotóxica, afecciones pulmonares, lesiones de hígado y riñón, carcinomas, inmunosupresora
TRICOTECENOS	<i>Fusarium</i>	Cereales	Afecciones sistema digestivo, circulatorio, nervioso y piel
ZEARELENONA	<i>Fusarium</i>	Cereales y subproductos	Afecciones sistema reproductor, estrógena

La micotoxicosis, nombre que recibe la intoxicación aguda causada por micotoxinas, suele ser baja o moderada en comparación con intoxicaciones debidas a contaminantes químicos o de origen microbiológico; sin embargo, una exposición crónica hace que las micotoxinas presenten

un mayor riesgo tóxico que los contaminantes de origen microbiológico o antropogénico como plaguicidas y aditivos u otros tipos de toxinas como las fitotoxinas o ficotoxinas.^{8, 12}

A lo largo de la historia han sido muchos los casos de micotoxicosis que han sucedido, como las muertes descritas en el Antiguo Testamento causadas por ergotismo¹³ o la enfermedad del “Fuego de San Antonio” en la Edad Media en Europa, debida al consumo de alimentos preparados con cereales contaminados con alcaloides ergóticos, producidos por el hongo *Claviceps purpurea* o ergot del centeno.¹² Otros casos más recientes fueron la aleucia tóxica alimentaria durante la Segunda Guerra Mundial, causada por la micotoxina tricoteceno T-2, o la nefropatía endémica de los Balcanes, ocasionada por ocratoxina A.¹¹⁻¹² En los años 60, tras la muerte de 10000 crías de pavos en el Reino Unido debida al consumo de piensos contaminados por aflatoxinas,¹² fue cuando se empezó a desarrollar la micotoxicología, ciencia multidisciplinar encargada del estudio de las toxinas que involucra a químicos, microbiólogos, ingenieros agrónomos, genetistas, médicos y veterinarios.

Junto con el desarrollo de la micotoxicología, los diferentes países han ido adaptando sus leyes sobre seguridad alimentaria, para evitar tanto las pérdidas económicas, como los efectos nocivos para la salud. En Europa, el organismo responsable es la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA). Fue en 2006 cuando se introdujo por primera vez en el reglamento de la Comunidad Económica Europea (CEE) los niveles máximos para una serie de micotoxinas en determinados productos alimentarios.¹⁴ Este Reglamento (CE) 1831/2003, entró en vigor el 1 de marzo de 2007 y, en lo que respecta a las micotoxinas, se ha modificado posteriormente hasta en cinco ocasiones. Pese a esto, la legislación comunitaria no establece ningún método de análisis específico para la determinación del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios, sino que establece unos criterios generales y específicos a los que debe ajustarse el método de análisis (Reglamento (CE) Nº401/2006 y 1781/2010).¹⁵⁻¹⁶ De este modo, cualquier método analítico puede emplearse siempre y cuando se adapte a los criterios y proporcione unos niveles de eficacia iguales o superiores a los establecidos en los reglamentos europeos anteriormente citados (401/2006 y 1781/2010).¹⁵⁻¹⁷ En el siguiente apartado se realiza una revisión bibliográfica de los diferentes métodos analíticos empleados para la determinación de micotoxinas.

1.1. Métodos analíticos para la determinación de micotoxinas

A día de hoy el análisis de micotoxinas en alimentos y piensos sigue siendo un reto para los químicos analíticos debido a numerosas razones, como por ejemplo la heterogeneidad de las

diferentes matrices alimentarias, la gran diversidad estructural que presentan las micotoxinas y los bajos niveles de detección y cuantificación exigidos.¹⁸

En el año 2015, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) recibió 495 notificaciones de alerta por la presencia de micotoxinas en alimentos.¹⁹ Esta cifra suele variar de año en año (por ejemplo 551 casos en 2016,²⁰ y solo 70 en 2017,²¹ último año del que se disponen datos). Pese a esto la UE, como se ha comentado antes, no ha establecido métodos analíticos oficiales para la determinación de micotoxinas, sino que ha regulado unos criterios generales que dichos métodos deben cumplir. Sí existen diversos métodos de análisis recomendados para la determinación de micotoxinas en alimentos, los llamados “métodos oficiales de análisis” de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (*Association of Official Analytical Chemists*, AOAC).²²

La mayoría de los métodos analíticos constan de las etapas de muestreo, homogenización, extracción, purificación y, finalmente, separación, detección y/o cuantificación.¹⁸ Usualmente, estas tres últimas etapas, se realizan mediante técnicas cromatográficas en combinación con diferentes tipos de detectores²³⁻²⁴ dependiendo de las propiedades de las micotoxinas, aunque también existen diferentes métodos basados en reacciones antígeno-anticuerpo.³

Son muy pocos los métodos analíticos desarrollados hasta el día de hoy que puedan determinar *directamente* la presencia de micotoxinas.²⁵ Normalmente, una vez realizado el muestreo (el cual sí se encuentra regulado en los reglamentos europeos 401/2006¹⁵ y 1781/2010¹⁶), la muestra precisa de un tratamiento previo que permita obtener una porción analítica representativa y adecuada a la técnica de medida para realizar dicho análisis. Para poder llevar a cabo la detección y/o cuantificación de la micotoxina, normalmente es necesario su extracción para aislarla de la matriz de la muestra, y una posterior etapa de limpieza del extracto que evite o reduzca los efectos de los componentes de la matriz.

Debido a la gran heterogeneidad de las diferentes matrices alimentarias y la distinta naturaleza química de las micotoxinas, se han desarrollado una gran variedad de técnicas para llevar a cabo dicho aislamiento. Entre las técnicas de extracción más empleadas se encuentran las de extracción tradicionales: extracción líquido-líquido con agitación (*liquid-liquid extraction*, *LLE*) o sólido-líquido con agitación (*solid-liquid extraction*, *SLE*).²⁶⁻²⁹ Estas se basan en la diferente solubilidad de las micotoxinas y de las impurezas en el disolvente empleado para la extracción.³⁰

Para la purificación y enriquecimiento de las micotoxinas generalmente se aplica la extracción en fase sólida (SPE, de sus siglas en inglés *Solid Phase Extraction*) utilizando diferentes materiales

adsorbentes.^{12,29} Entre los más utilizados se encuentran las columnas de extracción multifuncionales como las de intercambio iónico,³¹⁻³² la microextracción en fase sólida (*Solid Phase Micro-Extraction*, SPME),³³ la dispersión de matriz en fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD)³⁴ o las de inmutuafinidad (*ImmunoAffinity Column*, IAC).³⁵⁻³⁶ Pese a que las columnas de extracción multifuncionales no son específicas para la extracción de micotoxinas, si se han desarrollado algunas columnas SPE específicas como la MyCosep® 227³⁷ o la Bond Elut Mycotoxin³⁸ y, a niveles mucho más específicos, se encuentran las IACs, que contienen anticuerpos inmutuafizados, reteniendo de manera exclusiva una cierta micotoxina o una familia de ellas. Debido a su elevada especificidad, las IACs producen extractos más limpios con un nivel mínimo de interferencias de la matriz y excelente relación señal-ruído si se comparan con materiales adsorbentes, menos selectivos. Sin embargo, esta elevada especificidad hace que su uso en el análisis multi-toxina no sea viable; esto, junto con su elevado coste y la menor estabilidad química de los anticuerpos, son algunas de sus desventajas.³⁹⁻⁴¹ Para contrarrestarlas, se han desarrollado materiales basados en el reconocimiento molecular selectivo que mejora la extracción frente a matrices complejas: es el caso de los polímeros con impronta molecular (MIPs, *Molecularly Imprinted Polymers*). Los MIPs, a diferencia de las IACs, no sufren limitaciones en cuanto almacenamiento ni problemas de estabilidad respecto a los disolventes orgánicos. En el apartado 2 POLÍMEROS CON IMPRONTA MOLECULAR (MIPs) (p. 36) se describe con más detalle este tipo de materiales.

Finalizado el proceso de purificación y enriquecimiento de la muestra, tiene lugar la separación de los diferentes compontes que la forman. Esta se suele llevar a cabo mediante técnicas **cromatográficas**. La cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) y la cromatografía de gases (GC) son las más utilizadas en el análisis cuantitativo por su capacidad de separar micotoxinas de similar y diferente estructura química. Aun así, la menor sensibilidad, la necesidad de que los analitos sean volátiles y el riesgo de contaminación de la columna, han hecho que la GC esté cayendo en desuso, dejando la HPLC como la técnica por excelencia para la separación de micotoxinas.⁴² Para su detección se suelen emplear detectores de ultravioleta-visible (UV-Vis),⁴³ de fluorescencia (FL)⁴⁴ o de masas (MS). La HPLC-MS se considera como el método de referencia para la identificación inequívoca de micotoxinas.⁴⁵⁻⁴⁶ Comparada con otras técnicas de detección convencionales, ofrece mayor selectividad y sensibilidad, confirmación de la identidad del analito y la opción de usar sustancias marcadas isotópicamente como estándares internos.^{42,47} Pese a esto, el uso de detectores de fluorescencia, de un coste económico muy inferior a los de MS y un manejo más sencillo, está muy extendido en la determinación de micotoxinas en alimentos, ya que permite la detección de analitos en

concentraciones inferiores a las ppt (ng L^{-1}),⁴⁸ además de presentar un elevado grado de selectividad gracias a la posibilidad de elegir longitudes de onda concretas en las que solo absorba el analito de interés.⁴⁹⁻⁵⁰

Pese a las ventajas que presentan los métodos cromatográficos, estos suelen requerir una preparación laboriosa de la muestra, personal cualificado para realizar el análisis e instrumentación muy costosa y voluminosa que imposibilita la realización de ensayos instantáneos.⁵¹ Como alternativa a los métodos cromatográficos se presentan los métodos **inmunoquímicos** basados en receptores biológicos,³ como enzimas o anticuerpos, que dotan al método de un elevado grado de especificidad, permitiendo simplificar de forma significativa tanto las tareas de tratamiento de muestra, como los equipos que se suelen utilizar.⁵² De entre todos los métodos se pueden destacar los ensayos tipo ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*),^{45, 53-54} en los que una enzima covalentemente unida al anticuerpo, es el elemento generador de señal al catalizar una reacción entre sustancias presentes en el medio, que genera productos coloreados o luminiscentes. En su formato más simple, la detección en los ensayos tipo ELISA se basa en lectores visuales o colorimétricos, pero se puede lograr un aumento significativo de la sensibilidad empleando detectores fluorescentes o quimioluminiscentes.^{3, 55} Al igual que ocurre con las IACs, el empleo de receptores biológicos aumenta el coste del método a la vez que limita su uso a temperaturas y disolventes compatibles con dichos receptores. Una alternativa sería el uso de métodos analíticos basados en **receptores biomiméticos**, como los ya citados MIPs.⁵⁶⁻⁵⁷

De nuevo se observa que, tanto métodos cromatográficos como métodos analíticos basados en receptores biológicos o biomiméticos, hacen uso de la detección por fluorescencia debido a las ventajas que esta presenta. De la utilización de marcadores o indicadores **fluorescentes**, surge la necesidad de disponer de patrones de fluorescencia fiables y bien caracterizados.⁵⁸⁻⁶³ Con este fin, se participó en un estudio comparativo, auspiciado por la IUPAC, de medida y reproducibilidad interlaboratorio para la determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia de distintos patrones comerciales, abarcando el rango espectral desde los 250 nm a los 850 nm. Los resultados se presentan en un apéndice al final de la presente Tesis.

2. POLÍMEROS CON IMPRONTA MOLECULAR (MIPs)

Los polímeros con impronta molecular, abreviados como MIPs por sus siglas en inglés *Molecularly Imprinted Polymers*, son materiales sintéticos cuya función es reconocer de forma selectiva un analito o una familia de analitos.⁶⁴⁻⁶⁹

En 1931, el químico soviético Polyakov, mostró un aumento en la capacidad de absorción en partículas de sílice, preparadas a partir de silicato de sodio en presencia de aditivos orgánicos, en comparación con otros dos análogos estructurales que no presentaban dicho aditivos. Esta mejora se relacionó con un *efecto plantilla* del aditivo utilizado, convirtiéndose de esta forma en el primer ejemplo del uso de la impronta molecular.⁷⁰ Fue en 1972 cuando el Prof. Sarnhan y el Prof. Wulff⁷¹ sintetizaron el primer polímero orgánico con impronta molecular covalente utilizando monómeros vinílicos, lo que hizo despegar al campo de los MIPs.

Como se observa en la **Figura 2**, para la obtención de MIPs se realiza una polimerización alrededor de una molécula que actúa como *plantilla*. Para ello, en primer lugar, la plantilla se pone en contacto con el/los monómero/s funcional/es, de manera que se forma un complejo (o “aducto”) molécula plantilla-monómero/s mediante interacciones regenerables/reversibles de tipo *covalente* o *no covalente*. A continuación, se produce la polimerización en presencia de un monómero *entrecruzante* y de un iniciador de radicales, aplicando calor o radiación UV, lo que permite obtener una matriz insoluble en la que se encuentra atrapada la molécula plantilla. Una vez finalizada la polimerización se extrae la molécula plantilla, dejando en la estructura del polímero unas cavidades tridimensionales que son *complementarias* en tamaño, forma y grupos funcionales al analito de interés. Para mantener la conformación de las cavidades, también llamadas sitios o lugares de reconocimiento, la estructura molecular del polímero debe de ser una estructura 3D altamente entrecruzada; de otro modo, las cavidades se deformarían, perdiendo selectividad.^{64,68}

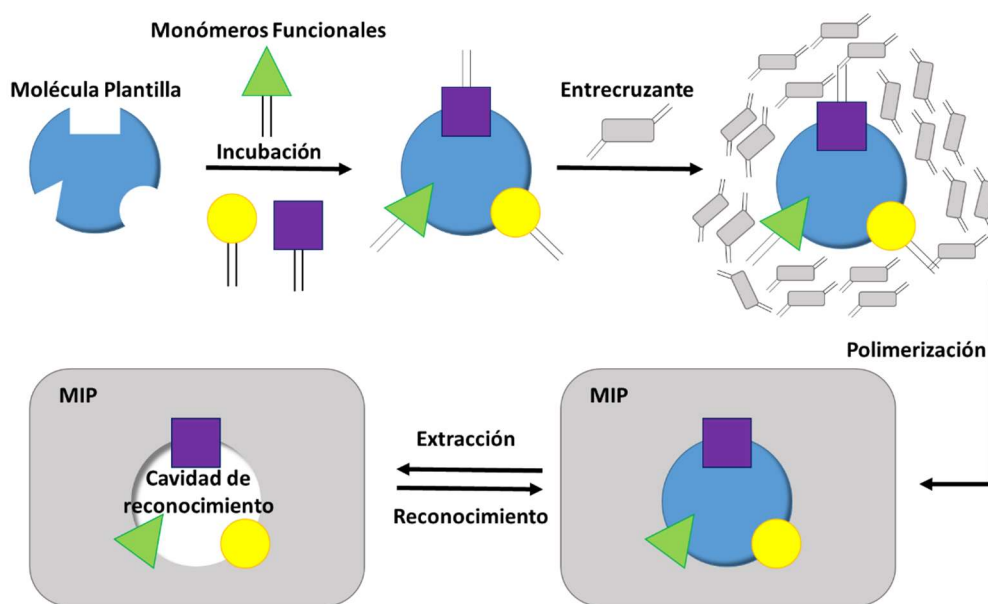


Figura 2. Representación esquemática de la síntesis de un MIP.

La mezcla de prepolimerización suele contener, como mínimo, un monómero funcional, un monómero entrecruzante, una molécula plantilla, un iniciador de la polimerización y un disolvente (también llamado “porógeno”):

- a) Molécula plantilla: responsable de las interacciones con los monómeros funcionales y, por tanto, de la generación de las cavidades de unión. Debe de ser estable en las condiciones de polimerización, soluble y no debe contener grupos polimerizables. Se suelen emplear grandes cantidades de esta molécula, con lo que muchas veces se utilizan moléculas análogas (“*sucedáneos*”), generalmente más baratas, obtenibles en el laboratorio y de menor toxicidad.
- b) Monómeros funcionales: responsables de las interacciones con la molécula plantilla en la cavidad específica; deben poseer grupos funcionales *complementarios* a la molécula plantilla: por ejemplo, si el analito diana es ácido, el monómero funcional será básico.
- c) Monómero entrecruzante: encargado de dotar de estabilidad a las cavidades de reconocimiento, tanto en tamaño y forma como en la disposición de los grupos funcionales.
- d) Monómeros diluyentes: no interactúan con la molécula plantilla, pero contienen grupos funcionales que mejoran la capacidad de reconocimiento del MIP.
- e) Disolvente: también recibe el nombre de *porógeno*, ya que es el responsable de la porosidad del MIP. Debe de propiciar la formación de una estructura porosa que permita la rápida difusión del analito.
- f) Iniciador: la naturaleza de este dependerá del *tipo de polimerización* que se realice.

A la hora de abordar la síntesis de un MIP, existen tres aproximaciones diferentes en función del tipo de impronta realizada:⁶⁴ i) impronta covalente, ii) impronta no covalente, iii) impronta semicovalente.

- i) Impronta covalente:^{69, 71} se basa en la formación de enlaces covalentes reversibles (regenerables) entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales. Una vez obtenido el MIP se rompen estos enlaces y se extrae el analito dejando libre la cavidad. Para que se produzca el reconocimiento molecular estos enlaces se deben de volver a formar, siendo la formación y rotura de enlaces covalentes la gran desventaja de este tipo de MIPs. Esta aproximación también se conoce como “modelo preorganizado” y se caracteriza por la obtención de cavidades de gran homogeneidad ya que la distribución de los grupos funcionales no es aleatoria, reduciendo, de este modo, las interacciones no específicas.⁷²

- ii) Impronta no covalente:⁷²⁻⁷⁴ también llamada “aproximación de autoensamblaje”. Es la más empleada en la actualidad debido a su sencillez, ya que no requiere la síntesis de un complejo previo con uniones covalentes, y su respuesta es más rápida. Se basa en la polimerización alrededor del complejo monómero funcional-analito que se forma mediante interacciones no covalentes. La principal desventaja es que la distribución no homogénea de los grupos funcionales puede favorecer la aparición de cavidades selectivas con diferentes constantes de unión, además de que la presencia de grupos funcionales fuera de las cavidades aumenta las interacciones no específicas.
- iii) Impronta semicovalente:⁷⁴ se trata de una mezcla de las dos anteriores donde la polimerización se realiza empleando un complejo monómero funcional-analito unido covalentemente, pero el reconocimiento se produce mediante interacciones no covalentes.

Para evaluar la contribución de las interacciones no específicas en el reconocimiento del analito, la síntesis del MIP debe ir acompañada de la obtención de otro polímero: un NIP (polímero sin impronta molecular, *Non-Imprinted Polymer*)⁷⁵ o un CIP (polímero de control con impronta molecular, *Control Imprinted Polymer*).⁷⁶ Un NIP es un polímero cuya síntesis se ha llevado a cabo en ausencia de la plantilla, mientras que un CIP se prepara con una molécula plantilla diferente a la del MIP, pero dotada de idéntica funcionalidad. Tanto el MIP, el NIP y el CIP se pueden obtener en diferentes formatos,⁶⁸ desde el sencillo “en masa” (*bulk*), a más sofisticados como la síntesis por moldeado o los nanogeles. A continuación, se hace una breve descripción.

- a) Polimerización en masa:⁶⁴ es la más simple y utilizada. Consiste en preparar una disolución que contiene todos los componentes de la mezcla. Una vez se ha desoxigenado, se lleva a cabo la polimerización, obteniéndose un polímero másico que se molutura y tamiza. Las grandes desventajas de este método son la heterogeneidad del tamaño de partículas y la pérdida de sitios de unión debida a la moluturación.
- b) Partículas esféricas: con ella se consigue aumentar el área superficial eficaz, aumenta la homogeneidad de las partículas obtenidas y se evita la pérdida de sitios de unión, ya que no es necesaria la moluturación. Las dos técnicas más comunes son:
 - a. Polimerización por precipitación:⁷⁷ sigue el mismo procedimiento que la síntesis en masa, pero diluyendo significativamente la mezcla de reacción (relación monómero/disolvente inferior al 5 % p/v). De esta forma, las cadenas poliméricas no coagulan, obteniéndose una dispersión de partículas independientes con una distribución de tamaños uniformes.

- b. Polimerización en *suspensión*:⁷⁸ la síntesis se lleva a cabo en una mezcla de dos fases inmiscibles. En el seno de las microgotas que se forman por la agitación, tiene lugar la polimerización.
- c) Síntesis por moldeado:⁷⁹⁻⁸¹ los polímeros se obtienen con una forma definida, ya que la polimerización se lleva a cabo en presencia de un molde
- d) Partículas núcleo-recubrimiento:^{75,82} sobre un material que actúa como semilla o punto de anclaje se hace crecer, de forma controlada, una pequeña capa del polímero. La gran ventaja de este tipo de partículas reside en el aprovechamiento de las propiedades que pueda ofrecer el núcleo para el reconocimiento.
- e) Membranas:⁸³ las membranas se obtienen polimerizando una fina capa de la mezcla de polimerización entre dos placas o embebiéndola en un soporte.
- f) Nanogeles:⁸⁴⁻⁸⁵ son materiales con un bajo grado de entrecruzamiento que carecen de forma definida, pero presentan una capacidad de reconocimiento y estabilidad elevados. Se obtienen como partículas comprendidas entre 10 y 300 nm. Para controlar su tamaño, la polimerización se lleva a cabo en presencia de una gran cantidad de disolvente o con agentes controladores de la polimerización, e.g. tipo RAFT.

Como ya se ha expuesto, los MIPs se han empleado de forma satisfactoria en técnicas de separación, como la SPE.⁸⁶ También se han aplicado en muchos otros campos como la síntesis, catálisis,⁸⁷ biorremediación,⁸⁸ transporte y liberación de sustancias,⁸⁹ pseudo-inmunoensayos⁸⁵ o en sensores,⁹⁰ como es el caso de la presente Tesis. Como receptores biomiméticos, presentan varias ventajas frente al uso de anticuerpos. En la **Tabla 2** se muestra un resumen comparativo de las propiedades de los MIPs vs receptores naturales como los anticuerpos.

Tabla 2. Características generales de los MIPs en comparación con los anticuerpos.^{3, 90-92}

	MIPs	Anticuerpos
Sitios de unión	Heterogeneidad	Homogeneidad
Síntesis	“Sencilla”	Difícil
Afinidad	Moderada: 10^3 - 10^9 M ⁻¹	Elevada: 10^9 - 10^{12} M ⁻¹
Coste	Económico	Elevado
Estabilidad	Resistentes a medios y condiciones extremos	Inestables en condiciones extremas, precisan medios controlados
Selectividad	Media-alta	Alta
Disolvente	Medios acuosos y orgánicos	Medios acuosos controlados
Cinética	Moderada	Rápida
Reutilizable	Si	De forma muy limitada
Versatilidad	En principio aplicable a cualquier molécula	Dependencia de la generación de anticuerpos para dicho analito

Los *sensores químicos*, como se explica más detalladamente en la introducción del capítulo 3, transforman la información química, que se produce al interaccionar el analito con el receptor, en una señal analítica medible.⁹³ Este tipo de señal puede ser muy distinta,⁹⁴ siendo las más utilizadas en los sensores basados en MIPs la electroquímica,⁹⁵ la piezoeléctrica⁹⁶ y la óptica.⁹⁷ Dentro de esta última, una de las técnicas que mayores ventajas presenta es la fluorescencia. En el campo de los sensores químicos de fluorescencia basados en el uso de MIPs, se pueden distinguir tres situaciones: i) el analito posee luminiscencia propia y se puede detectar directamente, ii) el analito no es fluorescente y se precisa la síntesis de un derivado fluorescente que puede emplearse en ensayos competitivos, iii) el polímero es fluorescente y su luminiscencia varía debido a la interacción con el analito. Por ejemplo, se pueden preparar MIPs con luminiscencia intrínseca basándose en el uso de polímeros conjugados luminiscentes (CLPs).

Fue en 2007 cuando el grupo del Prof. Nesterov⁹⁸ publicó por primera vez el uso de polímeros conjugados luminiscentes con (presunta) impronta molecular (PCLIMs) para la detección de TNT. Pese a que el trabajo fue realizado en 2007, hasta la fecha sólo se han publicado dos artículos más que combinen el concepto de MIPs con CLPs.⁹⁹⁻¹⁰⁰ En el trabajo del Prof. Nesterov se realiza una impronta covalente, obteniéndose un MIP en masa formado por cadenas entrecruzadas de un derivado del poli(vinilfenileno). Aunque en el trabajo se observa una importante respuesta del polímero a la presencia de TNT, en comparación con otras moléculas similares, *no se sintetiza ningún NIP o CIP* para poder determinar si la respuesta frente al TNT se debe a la especificidad conseguida por medio de la (presunta) impronta o si es fruto de otras interacciones no específicas. Los otros dos artículos sí hacen la comparación MIP vs. NIP, pero *no emplean ningún tipo de entrecruzante durante la polimerización*. Como se comentó anteriormente, la finalidad del monómero entrecruzante es la formación de una estructura tridimensional muy entrecruzada sólida e insoluble en cualquier disolvente, proporcionando una gran estabilidad estructural a las cavidades. Al suprimir el monómero entrecruzante la cavidad es menos robusta y los sitios de unión pueden perder su forma, lo que causaría una disminución de la selectividad del reconocimiento.

3. POLÍMEROS CONJUGADOS LUMINISCENTES (CLPs)

Desde el primer trabajo realizado por el Prof. Letheby sobre la síntesis de polímeros conjugados por oxidación de la anilina para obtener la polianilina,¹⁰¹ ha crecido mucho el interés en este campo. Este artículo, junto con el publicado por el Prof. Dall'Olio *et al.*,¹⁰² son considerados como los puntos de partida en el desarrollo de este tipo de polímeros.¹⁰³

Tradicionalmente los polímeros, junto con las moléculas orgánicas, se han considerado materiales no conductores y de ahí sus aplicaciones como aislantes térmicos y/o eléctricos. Fue en el año 1954 en el que se determinó la alta conductividad eléctrica por parte de una molécula orgánica, un derivado del perileno,¹⁰⁴ sirviendo así como precedente para el desarrollo de los primeros polímeros conductores. En 1963, el trabajo realizado por el Prof. Weis sobre la síntesis del polipirrol,¹⁰⁵ junto con los estudios realizados por el Prof. Berets y el Prof. Smith,¹⁰⁶ en el cual conseguían aumentar hasta 1000 veces la conductividad del poliacetileno al tratarlo con trifluoruro de boro, sirvieron para comprender cómo la conjugación π dotaba a los polímeros de propiedades semiconductoras. Pero no fue hasta 1977, año en el que los científicos Heeger, MacDiarmid y Shirakawa estudiaron las propiedades electrónicas y el dopado en fase gaseosa de películas de poliacetileno,¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ cuando se obtuvieron conductividades sin precedentes en un polímero orgánico, hecho que les valió el reconocimiento con el premio Nobel de Química en el año 2000.

Los polímeros conjugados se caracterizan por alternar en su cadena principal la presencia de enlaces simples con enlaces dobles o triples, permitiendo la superposición de los orbitales tipo p que, al estar ocupados únicamente por un electrón desapareado, permiten la deslocalización del mismo a lo largo de todo el esqueleto polimérico.¹⁰⁹⁻¹¹⁰ Esta deslocalización electrónica dota a los polímeros conjugados de dos propiedades fundamentales para su aplicación en el campo de los sensores como son su intensa *fluorescencia* y la *amplificación* de la señal.¹¹¹⁻¹¹²

Fue el Prof. Swager quien, en 1997, acuñó el término “cable molecular” para explicar el fenómeno de la amplificación de la señal que se observa en los polímeros conjugados. Dicha amplificación se traduce en la mejora de la sensibilidad de la respuesta de CLPs frente a la que se obtiene al emplear sondas moleculares o polímeros no conjugados¹¹³ como se ejemplifica en la **Figura 3**. En un sistema en el que los grupos receptores son *individuales* (no están conjugados electrónicamente), ya sea una sonda molecular (**Figura 3a**) o un polímero no conjugado (**Figura 3b**), el evento de unión se traduce en una desactivación (*quenching*) de la fluorescencia, la cual tiene lugar sólo en aquellas moléculas receptoras que forman complejos analito-receptor. La reducción en la emisión será, pues, igual a la fracción de ocupación por el analito. En un sistema de cable molecular o polímero conjugado luminiscente (**Figura 3c**), el excitón migra a través del polímero, muestreando una multitud de sitios receptores y quedando atrapado al encontrarse con un receptor unido a un analito, siendo por tanto el proceso de desactivación más eficaz. Por lo tanto, en un sistema con receptores conjugados (o *comunicados*) con ocupaciones fraccionarias inferiores, se producirá una desactivación de la fluorescencia superior que en un sistema no conjugado. En uno de sus primeros trabajos el Prof. Swager, consiguió demostrar un

aumento de la sensibilidad de hasta 65 veces de un polímero conjugado respecto a la unidad monomérica correspondiente.¹¹⁴

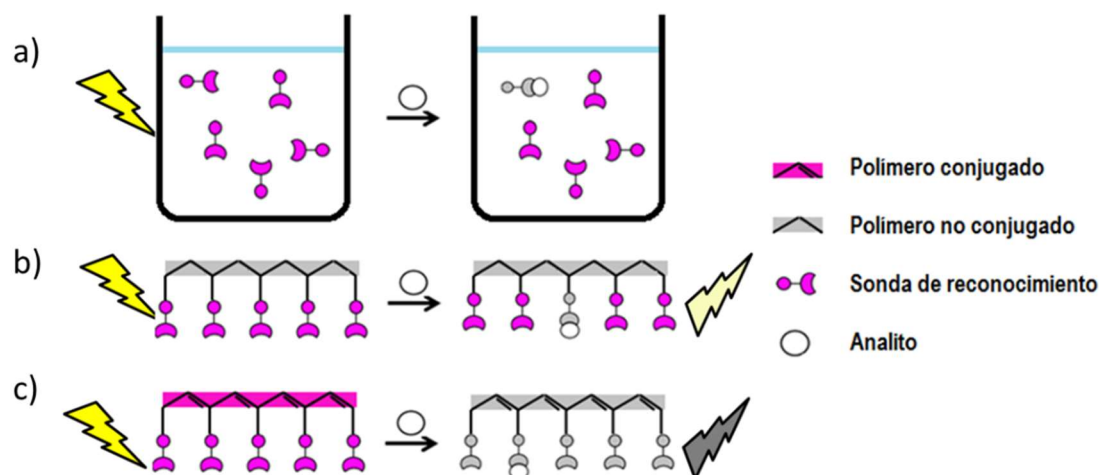


Figura 3. Comparación de las eficiencias de desactivación de la fluorescencia por la interacción sensor molecular-analito en diferentes materiales: a) sonda molecular individual en disolución; b) polímero no conjugado; c) polímero conjugado luminiscente.

Este efecto de amplificación de la señal solo se produce en propiedades colectivas del sistema y no en propiedades electrónicas locales, es decir, esta ganancia no se observaría en el caso de las medidas del desplazamiento químico en los espectros de RMN, debido a que el cambio en el desplazamiento químico generalmente es sólo sensible al entorno inmediato.¹¹³ Por el contrario sí se vería afectada de forma significativa la conductividad de las cargas eléctricas, permitiendo la elaboración de sensores químicos basados en la modificación de la resistividad química¹¹⁵⁻¹¹⁷ o, como en el caso expuesto, la modificación de la **intensidad de fluorescencia** del sistema (aumento¹¹⁸ ó disminución¹¹⁴) o el desplazamiento del **máximo** de emisión,¹¹⁹ ambos procesos influidos por el proceso de migración de la energía.¹²⁰

El proceso de migración de energía depende de cada sistema e intervienen diferentes mecanismos.¹¹⁴ Esta energía se debe a las cargas libres que se mueven a lo largo de la cadena en forma de excitones estrechamente ligados o como portadores libres.¹²¹ Así, una vez se ha generado el excitón, este se desplaza por la banda de conducción del polímero hasta que es atrapado por un defecto o aceptor, modificando durante su recorrido las propiedades electrónicas del polímero, como se puede observar en la **Figura 4**.

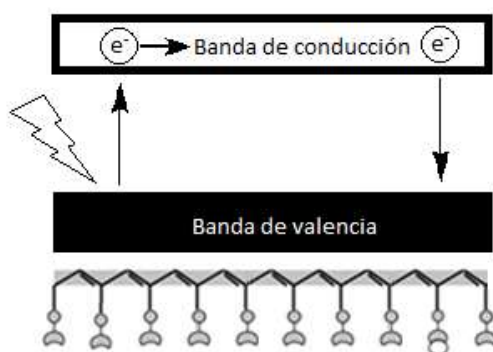


Figura 4. Diagrama de bandas que ilustra el mecanismo por el cual el conjunto de receptores conectados entre sí por enlaces dobles conjugados puede producir una mejora en la respuesta del sensor. El excitón se crea por absorción de un fotón ($h\nu$) y éste migra a lo largo de la cadena principal del polímero hasta que la unión analito-receptor produce un sitio de captura donde el excitón queda atrapado, produciendo su desactivación.

El grado de mejora resultante de la migración de energía está determinado por el tiempo de vida radiativo y la movilidad del excitón a lo largo del polímero. Tiempos de vida más largos y movilidades más altas producirán *longitudes de difusión* más largas. Si esta longitud de difusión supera la longitud del polímero, un aumento en el peso molecular producirá una mejora en la amplificación de la señal, hasta un valor límite para el cual el tamaño del polímero sea superior a la longitud de difusión del excitón y la amplificación ya no se vea mejorada por el crecimiento de la cadena polimérica.¹¹² En el artículo citado anteriormente, el grupo del Prof. Swager demostró que, cuando duplicaban el tamaño de la cadena del polímero (de M_n 31000 a M_n 65000) se producía un aumento considerable en la desactivación de la fluorescencia para una misma cantidad de analito pero que, cuando el valor de M_n pasaba de 65000, la desactivación de la fluorescencia apenas se veía afectada.^{114, 121} Otros factores que también influyen de forma significativa en la amplificación son la posición en *meta* o *para* de los sustituyentes de la cadena principal, debido a que la deslocalización de las cargas es menor,¹²² así como el carácter electrofílico de estos o el rendimiento cuántico de fluorescencia.¹¹⁴

Gracias al efecto de la amplificación de la señal que muestran este tipo de materiales, junto con la utilización de la fluorescencia como señal de transducción del evento de unión, técnica mucho más sensible y selectiva que muchas otras de origen óptico,^{113,118,123} se puede incrementar significativamente la sensibilidad del sensor sin aumentar la constante de asociación receptor-analito.¹²¹ Aumentar la *constante de asociación* del evento de reconocimiento puede tener la desventaja de respuestas irreversibles o tiempos de restablecimiento muy largos, lo que se traduce en la imposibilidad de producir una respuesta reversible en tiempo real.^{113, 117} Este tipo de sistemas moleculares se denominan correctamente *indicadores*.¹¹³ Éstos se pueden utilizar

en un dispositivo sensor pero, para ello, es necesario implantar una etapa adicional para que el analito se disocie del receptor presentando la desventaja de introducir una complejidad adicional en los dispositivos.¹¹³

3.1. Aplicaciones de los CLPs

La gran diversidad de estructuras poliméricas que presentan este tipo de materiales hacen que su campo de aplicación sea muy amplio. Su baja toxicidad y biocompatibilidad,¹²⁴⁻¹²⁵ junto con sus propiedades eléctricas¹¹⁰ y ópticas,¹²⁶ su estabilidad fotoquímica, sus elevados rendimientos cuánticos de fluorescencia y coeficientes de absorción, o su fotoconductividad, hacen posible su aplicación en diferentes campos como son la bioquímica y la biomedicina (administración dirigida de fármacos),¹²⁷ la fotovoltaica (elaboración de OLEDs o celdas solares orgánicas),¹²⁸⁻¹²⁹ la electrónica (fabricación de transistores orgánicos)¹²⁹ o la fotónica (síntesis de nuevos materiales para su aplicación en láseres),¹²⁹⁻¹³⁰ sin olvidar el campo de los sensores químicos/bioquímicos,^{111, 126, 131} que hacen uso de la amplificación de la señal y cuyo fin es el buscado en esta Tesis.

El estado actual del campo de los CLPs, con una gran versatilidad en cuanto a reacciones y formatos de síntesis,¹³²⁻¹³³ permite el diseño de una amplia diversidad de polímeros, que pueden adaptarse a diferentes aplicaciones. Gracias a la funcionalización, tanto de las cadenas poliméricas como de las cadenas laterales, no solo se pueden modificar los espectros de absorción y/o emisión, sino otras propiedades como la solubilidad o la conductividad. Incluso se puede llegar a invertir su baja afinidad electrónica (característica propia de los polímeros conjugados que suelen ser ricos en electrones), y producir así polímeros deficientes en electrones.¹¹¹ Esta funcionalización se puede llevar a cabo introduciendo directamente los grupos funcionales deseados, ya sea porque el propio monómero los contenga o una vez producida la polimerización a través de un grupo que pueda reaccionar con otra molécula que incluya el grupo funcional deseado. También se puede llevar a cabo la funcionalización encapsulando los grupos de reconocimiento por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.¹²⁴

En la bibliografía existe una gran variedad de artículos que emplean diferentes grupos funcionales para la aplicación de CLPs en el diseño de nuevos sensores químicos.^{111, 124, 126} Los grupos funcionales varían desde moléculas discretas con grupos nitrógeno sensibles a cambios de pH,¹³⁹ a éteres corona empleados para la detección de cationes¹⁴⁰ o grandes moléculas como anticuerpos¹⁴¹ y enzimas¹⁴² para la detección de antígenos o proteínas, respectivamente.^{109, 131} Del mismo modo, los medios de transducción de la señal de interacción analito-receptor

(absorción, emisión, conductividad, resistividad, etc.)¹³¹ existentes presentan también un gran abanico de posibilidades, haciendo de los polímeros conjugados materiales en auge para su uso en este campo. Como ejemplo, en la **Figura 5** se muestran diferentes CLPs empleados en la elaboración de sensores ópticos de diferentes analitos de interés químico.

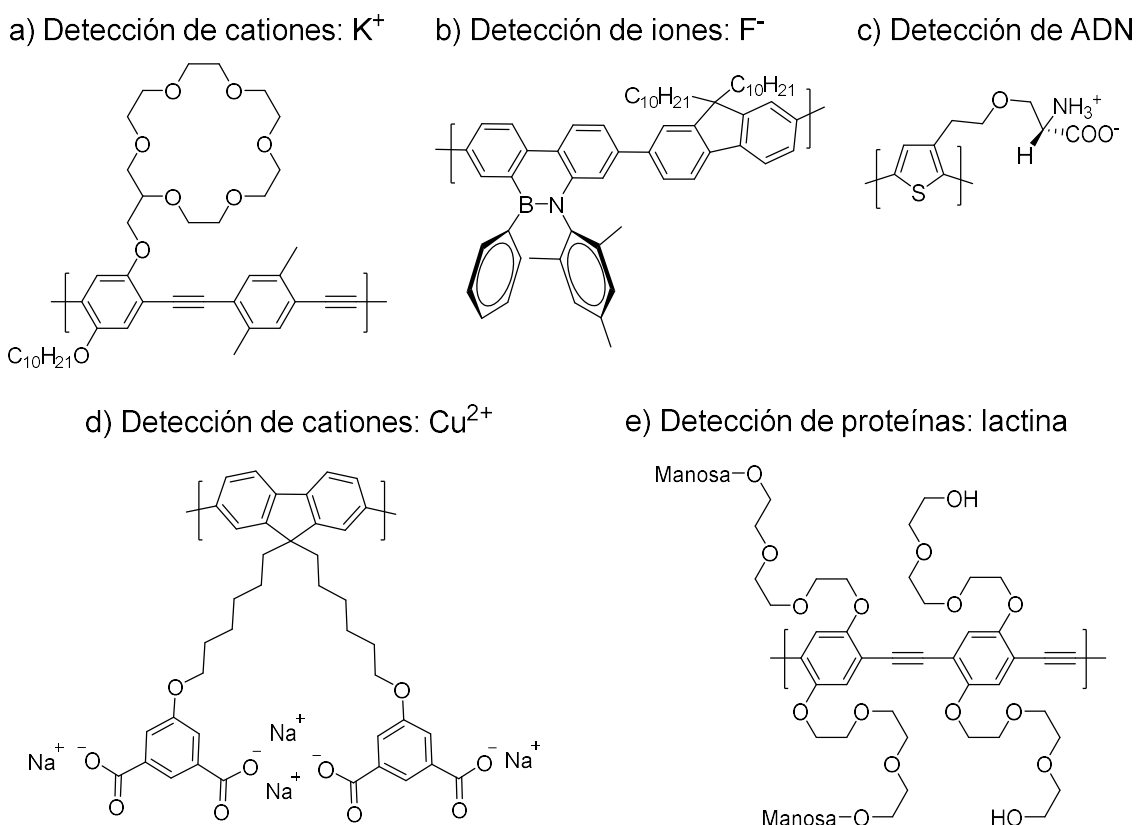


Figura 5. Estructuras de diferentes CLPs empleados en la elaboración de sensores ópticos para la detección de a) y d) cationes,¹³⁴⁻¹³⁵ b) iones,¹³⁶ c) ADN,¹³⁷ y e) proteínas.¹³⁸

4. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Los contaminantes químicos considerados como peligrosos, entre los que se incluyen algunos tipos de micotoxinas, influyen en la tasa creciente de enfermedades crónicas como infertilidad, defectos de nacimiento, deterioro del sistema inmunológico, lesiones cerebrales, etc.³⁻⁴ Por ello, no es de extrañar que, en los últimos años, el interés por la seguridad alimentaria se haya convertido en una preocupación creciente no sólo para los poderes públicos y productores del sector alimentario sino para el conjunto de la sociedad. Paralelamente a la mayor preocupación por la toxicidad de los alimentos, las técnicas analíticas han experimentado un enorme avance⁵⁻⁶ y, con ellas, la tecnología de sensores químicos, que está alcanzando un extraordinario grado de sofisticación como alternativa a los métodos cromatográficos que requieren grandes y costosos equipos, así como personal especializado.

Con el fin último de desarrollar nuevos *sensores químicos* que satisfagan las necesidades de sensibilidad y selectividad necesarias para la determinación de micotoxinas en alimentos, se plantea la presente Tesis, la cual trata de combinar, por una parte, el campo de **los MIPs** para la obtención de nuevos elementos de *reconocimiento* molecular que mimeticen el comportamiento de sus análogos naturales (anticuerpos), superando sus limitaciones (fragilidad, coste, versatilidad...) y, por otra, **los CLPs** capaces de *amplificar* significativamente la detección de los eventos de interacción resultantes del reconocimiento, para alcanzar la sensibilidad (límite de detección) que sólo consigue la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía. Con la combinación de estas dos áreas se obtendrían *polímeros conjugados fluorescentes*, entrecruzados y selectivos con *impronta molecular* (PCLIMs), capaces de detectar analitos de interés en concentraciones muy inferiores a las conseguidas por sondas moleculares debido a la amplificación de la señal. Se han perseguido los siguientes objetivos individuales:

1. Preparación de moléculas **análogas a las micotoxinas** fumonisina B₁ y citrinina para su empleo como plantillas para la síntesis de MIPs, estudios de interacción receptor-analito, o como sondas en inmunoensayos fluorescentes competitivos. La síntesis de moléculas análogas a los analitos diana es interesante para su empleo en la preparación de MIPs, debido al elevado coste que presentan las micotoxinas. Otra ventaja es que los análogos, por lo general, presentan una menor toxicidad. Finalmente, no todas las moléculas poseen fluorescencia intrínseca, con lo cual no pueden utilizarse en ensayos fluorescentes competitivos y por ellos se hace necesario el *marcado* con sondas luminiscentes.
2. Síntesis y caracterización de **nuevos receptores fluorescentes**, como *modelos* moleculares de los CLPs. Estas nuevas moléculas, derivadas del 1,4-diestirilbenceno (**DSB**), están formadas por tres unidades bencílicas conectadas entre sí por enlaces dobles, que imitarían

a un pequeño oligómero de tres unidades monoméricas del poli(vinilfenileno). La finalidad de la síntesis de estas moléculas es facilitar los estudios de interacción receptor-analito, al tratarse de moléculas discretas y solubles, para poder extrapolar así los resultados obtenidos al diseño de CLPs entrecruzados e insolubles.

- 2.1. Estudio de la **respuesta óptica** de los “bloques precursores” frente a diferentes analitos de interés (ion fluoruro y acetato, ácidos orgánicos, sucedáneos de micotoxinas carboxiladas (objetivo 1) y ácidos orgánicos). Estudio de la influencia del carácter electrodador/aceptor de sustituyentes introducidos en la cadena principal del núcleo de **DSB**.
- 2.2. Caracterización de los distintos **procesos fotoquímicos** que tienen lugar en el estado excitado de los diferentes bloques precursores de CLPs, gracias al uso de técnicas espectroscópicas ultrarrápidas como la absorción transitoria con láseres de *femtosegundos*. Además de la caracterización fotofísica y fotoquímica de las moléculas luminiscentes, se llevará a cabo la caracterización y estudio de la interacción con el anión acetato (como anión modelo del carboxilato), así como la interacción con otros analitos de interés (fluoruro y sucedáneos de citrinina y ocratoxina A).
3. Síntesis y caracterización de **CLPs entrecruzados** para su posible aplicación en el campo de los sensores químicos. Valoración de su respuesta óptica frente a los mismos analitos que sus bloques precursores homólogos (objetivo 2), y comparación de la respuesta CLP vs. *bloque precursor molecular* para o descartar la amplificación de la respuesta fotoquímica como consecuencia de la deslocalización electrónica.
4. Síntesis y caracterización de **polímeros conjugados luminiscentes con impronta molecular** (PCLIMs). Evaluación del efecto de amplificación de la señal y de la impronta molecular por comparación con los CLPs sin impronta del objetivo 3.

Adicionalmente, se llevará a cabo la caracterización espectroscópica de diferentes fluoróforos cuya absorción y emisión abarca el intervalo espectral desde 250 nm a 850 nm. Dichos fluoróforos se pueden emplear como estándares en la determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_f) para la caracterización óptica de distintas moléculas sintetizadas en la Tesis. Este estudio se engloba dentro de un proyecto de la IUPAC consistente en la determinación y comparación interlaboratorio de los valores obtenidos experimentalmente de rendimientos cuánticos de fluorescencia. Se pretende evaluarla reproducibilidad y la variabilidad entre laboratorios de las mediciones de Φ_f "de rutina" y ampliar la oferta de estándares comerciales para la medición de Φ_f por el método relativo (Parker-Rees).

4.1. Aim of the research

Among the chemical contaminants of food considered to be dangerous, some types of mycotoxins are included. Mycotoxins can affect the increasing rate of chronic diseases such as infertility, birth defects, damage of the immune system, brain injuries, etc.³⁻⁴ Therefore, it is not surprising that in recent years the interest in food security has become a growing concern not only for the public authorities and producers of the sector, but also for the entire society. Food analytical techniques have experienced a great development⁵⁻⁶ and the technology of chemical sensors is reaching an extraordinary degree of sophistication as an alternative to chromatographic methods that require large and expensive equipment as well as specialized personnel.

The main goal of this Thesis is to develop novel materials for chemical sensing that satisfy the sensitivity and selectivity requirements necessary for mycotoxins determination in food. For that reason two different fields are combined: on the one hand, the so-called **molecularly imprinted polymers** to obtain new elements for molecular recognition that mimic the behaviour of their natural analogues (antibodies) while overcoming their limitations (fragility, cost, versatility...) and, on the other hand, **conjugated luminescent polymers** able to amplify the response of the selective interaction analyte-receptor event to reach the sensitivity (limit of detection) that only mass spectrometry coupled to chromatography achieves. The combination of this two fields would provide fluorescent conjugated molecularly-imprinted polymers (PCLIMs), crosslinked and selective to the target molecules thanks to the molecular imprinting process, which will be able to detect analytes in lower concentration than molecular probes thanks to the signal amplification. The following individual objectives have been pursued:

1. Development of analogue molecules (*surrogates*) to fumonisin B₁ and citrinin mycotoxins for their use as templates in the MIPs synthesis, receptor-analyte interaction studies, or as probes in competitive fluorescence immunoassays. The synthesis of surrogates is interesting for its use in the preparation of MIPs due to the high cost of the natural mycotoxins. Another advantage is that analogues usually have less toxicity. Finally, not all molecules have intrinsic fluorescence, which means that they cannot be used in competitive fluorescence assays and, therefore, it makes labelling them with luminescent probes necessary.
2. Synthesis and characterization of new fluorescent receptors (*building blocks*), as molecular models of CLPs. These new molecules are based on the chemical structure of 1,4-diethyrylbenzene (**DSB**). They are formed by three benzylic units connected to each other by double bonds that would mimic a small oligomer of three monomer units of the poly(vinylbenzene). The purpose of the synthesis of these molecules is to simplify the

studies of the receptor-analyte interaction, since they are discrete and soluble (small) molecules. This results will be extrapolated to the synthesis of crosslinked insoluble CLPs.

- 2.1. Evaluation of the optical response of the building blocks against different analytes (fluoride and acetate ions, mimics of carboxylated mycotoxins (objective 1), and acid groups), as well as the effect of the addition of various substituents with different electron-donating characteristics on the aromatic rings.
- 2.2. Characterization of the different photochemical processes that take place in the excited state of the different CLP building blocks, thanks to the use of ultra-fast spectroscopic techniques such as transient absorption with femtosecond lasers. In addition to the photophysical and photochemical characterization of the luminescent molecules, the characterization and study of the interaction of the acetate anion (as a model of the carboxylate group) will be carried out, as well as of the interaction with other analytes of interest (fluoride and surrogates of citrinin and ochratoxin A).
3. Synthesis and characterization of crosslinked CLPs for their possible application in the chemical sensor field. Study of the optical response against the same analytes as their homologous building blocks (objective 2), in order to compare the response of both and to confirm the signal amplification effect in the photochemical response produced by the analyte-receptor interaction.
4. Synthesis and characterization of luminescent conjugated polymers with molecular imprinting (PCLIMs). Study of the signal amplification in the recognition event and imprinting effect by comparison with the CLPs without imprinting from the objective 3.

In addition, the spectroscopic characterization of different fluorophores will be carried out. Their absorption and emission covers the spectral range from 250 nm to 850 nm. These fluorophores will be used for the fluorescence quantum yield (Φ_f) determination for some molecules synthesized in this Thesis. This study is part of an IUPAC project which consists in the fluorescence quantum yield determination for an inter-laboratory comparison exercise to obtain information on the precision and reproducibility of the measurements, in addition to the increase of the number of standards available for the measurement of Φ_f using the relative method (Parker-Rees).

5. **BIBLIOGRAFÍA**

1. Pitt, J., What are mycotoxins? *Mycotoxin Newsl.*, **1996**, 7 (4), 1.
2. Goyal, S.; Ramawat, K.; Mérillon, J.-M., Different shades of fungal metabolites: an overview, *Springer: Switzerland*, **2017**, 1-29.
3. Peltomaa, R.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C., Bioinspired recognition elements for mycotoxin sensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2018**, 410 (3), 747-771.
4. Carrillo, L.; Audisio, M. C., Manual de Microbiología de los Alimentos. <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/> (último acceso marzo 2019)
5. Bhat, R.; Rai, R. V.; Karim, A. A., Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns, *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.*, **2010**, 9 (1), 57-81.
6. Wu, F., Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **2007**, 137 (3), 363-374.
7. Wu, F., Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards, *Environ. Sci. Technol.*, **2004**, 38 (15), 4049-4055.
8. Martínez-Larrañaga, M. R.; Anadón, A., Micotoxinas. In Toxicología alimentaria, Cameán, A. M.; Reppetto, M., Eds. *Ediciones Díaz Santos*: Spain, **2012**, 289-307.
9. Rubinstein, H. R.; Theumer, M. G.; Ramos, A. J., Micotoxinas y micotoxicosis, *AMV Ediciones*: Spain, **2011**.
10. Bennett, J. W.; Klich, M., Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2003**, 16 (3), 497-516.
11. Peraica, M.; Radić, B.; Lucić, A.; Pavlović, M., Toxic effects of mycotoxins in humans, *Bull. World Health Organ.*, **1999**, 77 (9), 754-766.
12. Soriano del Castillo, J. M., Micotoxinas en alimentos. *Ediciones Diaz de Santos*: Spain, **2007**.
13. Schoental, R., Mycotoxins and the Bible, *Perspect. Biol. Med.*, **1984**, 28 (1), 117-120.
14. Reglamento (CE) Nº 1881/2006 of 19 December 2006 por el que se establecen niveles máximos para ciertos contaminantes en los alimentos, Off. J. Eur. Union L364 (2006) 5.
15. Reglamento (CE) Nº 401/2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. DOUE (2006) 12.
16. Reglamento (CE) Nº 1781/2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) Nº 401/2006 en lo que respecta a los cacahuetes y otras semillas oleaginosas, a los frutos de cáscara arbóreos, a los huesos de albaricoque, al regaliz y al aceite vegetal. DOUE L52 (2010) 32.
17. Ministerio de Agricultura y Pesca, A. y. M. A., *Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas*. Madrid, **2016**.

18. Pereira, V. L.; Fernandes, J. O.; Cunha, S. C., Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis, *Trends Food Sci. Technol.*, **2014**, 36 (2), 96-136.
19. AECOSAN
http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/alertas/sciri/MEMORIA_SCIRI_2015.pdf (último acceso marzo 2019).
20. AECOSAN
http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/alertas/sciri/MEMORIA_SCIRI_2016.pdf (último acceso marzo 2019).
21. AECOSAN,
http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/alertas/sciri/MEMORIA_SCIRI_2017.pdf (último acceso marzo 2019).
22. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 21 ed.; AOAC International: EEUU, **2019**.
23. Urraca, J. L.; Marazuela, M. D.; Moreno-Bondi, M. C., Analysis for zearalenone and α -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 524 (1), 175-183.
24. Decler, M.; Rajkovic, A.; Sas, B.; Madder, A.; De Saeger, S., Development and validation of ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods for the simultaneous determination of beauvericin, enniatins (A, A1, B, B1) and cereulide in maize, wheat, pasta and rice, *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1472, 35-43.
25. Singh, C. B.; Jayas, D. S., Spectroscopic techniques for fungi and mycotoxin detection. In *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*, De Saeger, S., Ed. Woodhead Publishing Limited: UK, **2011**, 401-415.
26. Meneely, J. P.; Ricci, F.; van Egmond, H. P.; Elliott, C. T., Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food, *Trac-Trends Anal. Chem.*, **2011**, 30 (2), 192-203.
27. Juan, C.; Chamari, K.; Oueslati, S.; Mañes, J., Rapid quantification method of three alternaria mycotoxins in strawberries, *Food Anal. Meth.*, **2016**, 9 (6), 1573-1579.
28. Shanakhat, H.; Sorrentino, A.; Raiola, A.; Romano, A.; Masi, P.; Cavella, S., Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: an overview, *J. Sci. Food Agric.*, **2018**, 98 (11), 4003-4013.
29. Zöllner, P.; Mayer-Helm, B., Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1136 (2), 123-169.

30. Abou-Hany, R. A. G.; Urraca, J. L.; Descalzo, A. B.; Gómez-Arribas, L. N.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G., Tailoring molecularly imprinted polymer beads for alternariol recognition and analysis by a screening with mycotoxin surrogates. *J. Chromatogr. A*, **2015**, *1425*, 231-239.
31. Mogensen, J. M.; Larsen, T. O.; Nielsen, K. F., Widespread occurrence of the mycotoxin fumonisin B2 in wine, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58* (8), 4853-4857.
32. von Barga, K. W.; Lohrey, L.; Cramer, B.; Humpf, H.-U., Analysis of the Fusarium Mycotoxin Moniliformin in cereal samples using ¹³C₂-moniliformin and high-resolution mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60* (14), 3586-3591.
33. Moazami, E. F.; Jinap, S., Optimisation of the determination of deoxynivalenol in wheat flour by HPLC and a comparison of four clean-up procedures, *Food Addit. Contam. Part A-Chem.*, **2009**, *26* (9), 1290-1297.
34. Serrano, A. B.; Font, G.; Ruiz, M. J.; Ferrer, E., Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area, *Food Chem.*, **2012**, *135* (2), 423-429.
35. Cichna-Markl, M., New strategies in sample clean-up for mycotoxin analysis, *World Mycotoxin J.*, **2011**, *4* (3), 203-215.
36. Rubert, J.; Soriano, J. M.; Mañes, J.; Soler, C., Occurrence of fumonisins in organic and conventional cereal-based products commercialized in France, Germany and Spain, *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, *56*, 387-391.
37. Berthiller, F.; Schuhmacher, R.; Buttinger, G.; Krska, R., Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1062* (2), 209-216.
38. Wang, S.; Cheng, L.; Ji, S.; Wang, K., Simultaneous determination of seventeen mycotoxins residues in Puerariae lobatae radix by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, *98*, 201-209.
39. Castegnaro, M.; Tozlovanu, M.; Wild, C.; Molinié, A.; Sylla, A.; Pfohl-Leszkowicz, A., Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2006**, *50* (6), 480-487.
40. Şenyuva, H. Z.; Gilbert, J., Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review, *J. Chromatogr. B*, **2010**, *878* (2), 115-132.
41. Li, W.; Powers, S.; Dai, S., Using commercial immunoassay kits for mycotoxins: 'Joys and sorrows'?, *World Mycotoxin J.*, **2014**, *7* (4), 417-430.
42. Holčápek, M.; Jirásko, R.; Líba, M., Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1259*, 3-15.

43. Frisvad, J. C.; Thrane, U., Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV—VIS spectra (diodearray detection), *J.Chromatogr.A*, **1987**, *404*, 195-214.
44. Hernández, M. J.; García-Moreno, M. V.; Durán, E.; Guillén, D.; Barroso, C. G., Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, *566* (1), 117-121.
45. de Saeger, D., Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed, *Woodhead Publishing Limited: UK*, **2011**, 401-415.
46. Streit, E.; Schwab, C.; Sulyok, M.; Naehrer, K.; Krska, R.; Schatzmayr, G., Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients, *Toxins* **2013**, *5* (3), 504-523.
47. Senyuva, H. Z.; Gökmen, V.; Sarikaya, E. A., Future perspectives in Orbitrap™-high-resolution mass spectrometry in food analysis: a review, *Food Addit. Contam. Part A-Chem.*, **2015**, *32* (10), 1568-1606.
48. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2 ed., *Wiley-VCH Verlag GmbH: Germany*, **2012**.
49. Borisov, S. M.; Wolfbeis, O. S., Optical biosensors, *Chem. Rev.*, **2008**, *108* (2), 423-461.
50. McDonagh, C.; Burke, C. S.; MacCraith, B. D., Optical Chemical Sensors, *Chem. Rev.*, **2008**, *108* (2), 400-422.
51. Koczula, Katarzyna M.; Gallotta, A., Lateral flow assays, *Essays Biochem.*, **2016**, *60* (1), 111.
52. Berthiller, F.; Brera, C.; Crews, C.; Iha, M. H.; Krska, R.; Lattanzio, V. M. T.; MacDonald, S.; Malone, R. J.; Maragos, C.; Solfrizzo, M., Developments in mycotoxin analysis: An update for 2014–2015, *World Mycotoxin J.*, **2016**, *9*, 5-30.
53. Bolechová, M.; Benešová, K.; Běláková, S.; Čáslavský, J.; Pospíchalová, M.; Mikulíková, R., Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic, *Food Control*, **2015**, *47*, 108-113.
54. Kong, D.; Xie, Z.; Liu, L.; Song, S.; Kuang, H.; Cui, G.; Xu, C., Development of indirect competitive ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the detection of sterigmatocystin in cereal products, *Food Agric. Immunol.*, **2017**, *28* (2), 260-273.
55. Goryacheva, I. Y.; Saeger, S. D.; Eremin, S. A.; Peteghem, C. V., Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening: A review, *Food Addit. Contam.*, **2007**, *24*, 1169-1183.

56. Ye, L.; Mosbach, K., Molecular imprinting: synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors, *Chem. Mat.*, **2008**, 20 (3), 859-868.
57. Zourob, M., Recognition receptors in biosensors, *Springer: USA*, **2010**.
58. Boens, N.; Qin, W.; Basarić, N.; Hofkens, J.; Ameloot, M.; Pouget, J.; Lefèvre, J.-P.; Valeur, B.; Gratton, E.; vandeVen, M.; Silva, N. D.; Engelborghs, Y.; Willaert, K.; Sillen, A.; Rumbles, G.; Phillips, D.; Visser, A. J. W. G.; van Hoek, A.; Lakowicz, J. R.; Malak, H.; Gryczynski, I.; Szabo, A. G.; Krajcarski, D. T.; Tamai, N.; Miura, A., Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Anal. Chem.*, **2007**, 79 (5), 2137-2149.
59. Rurack, K.; Spieles, M., Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600–1000 nm, *Anal. Chem.*, **2011**, 83 (4), 1232-1242.
60. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U., Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples, *Nat. Protoc.*, **2013**, 8, 1535.
61. Resch-Genger, U.; Hoffmann, K.; Nietfeld, W.; Engel, A.; Neukammer, J.; Nitschke, R.; Ebert, B.; Macdonald, R., How to improve quality assurance in fluorometry: fluorescence-inherent sources of error and suited fluorescence standards, *J. Fluoresc.*, **2005**, 15 (3), 337-362.
62. Resch-Genger, U.; DeRose Paul, C., Fluorescence standards: classification, terminology, and recommendations on their selection, use, and production (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **2010**, (82), 2315-2335.
63. Meech, S. R.; Phillips, D., Photophysics of some common fluorescence standards, *J. Photochem.*, **1983**, 23 (2), 193-217.
64. Vasapollo, G.; Sole, R. D.; Mergola, L.; Lazzoi, M. R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; Mele, G., Molecularly imprinted polymers: present and future prospective, *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, 12 (9), 5908-5945.
65. Mosbach, K.; Ramström, O., The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Nat. Biotechnol.*, **1996**, 14 (2), 163-170.
66. Haupt, K., Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, *Analyst*, **2001**, 126 (6), 747-756.
67. Chen, L.; Xu, S.; Li, J., Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40 (5), 2922-2942.
68. Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z., Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 804 (1), 173-182.
69. Andersson, L. I., Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *J. Chromatogr. B*, **2000**, 745 (1), 3-13.

70. Polyakov, M. V., Adsorption properties and structure of silica gel. *Zh. Fiz. Khim.* **1931**, *2*, 799–805.
71. Wulff, G.; Sarhan, A., Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur racemattrennung, *Angew. Chem.*, **1972**, *84* (8), 364-364.
72. Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *J. Mol. Recognit.*, **2006**, *19* (2), 106-180.
73. Arshady, R.; Mosbach, K., Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Makromol. Chem.*, **1981**, *182* (2), 687-692.
74. Mayes, A. G.; Whitcombe, M. J., Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57* (12), 1742-1778.
75. Carrasco, S.; Benito-Peña, E.; Navarro-Villoslada, F.; Langer, J.; Sanz-Ortiz, M. N.; Reguera, J.; Liz-Marzán, L. M.; Moreno-Bondi, M. C., Multibranched gold–mesoporous silica nanoparticles coated with a molecularly imprinted polymer for label-free antibiotic surface-enhanced raman scattering analysis, *Chem. Mat.*, **2016**, *28* (21), 7947-7954.
76. Poma, A.; Guerreiro, A.; Caygill, S.; Moczko, E.; Piletsky, S., Automatic reactor for solid-phase synthesis of molecularly imprinted polymeric nanoparticles (MIP NPs) in water, *RSC Adv.*, **2014**, *4* (8), 4203-4206.
77. Yoshimatsu, K.; Reimhult, K.; Krozer, A.; Mosbach, K.; Sode, K.; Ye, L., Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: The control of particle size suitable for different analytical applications, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *584* (1), 112-121.
78. Zourob, M.; Mohr, S.; Mayes, A. G.; Macaskill, A.; Pérez-Moral, N.; Fielden, P. R.; Goddard, N. J., A micro-reactor for preparing uniform molecularly imprinted polymer beads, *Lab Chip*, **2006**, *6* (2), 296-301.
79. Urraca, J. L.; Castellari, M.; Barrios, C. A.; Moreno-Bondi, M. C., Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1343*, 1-9.
80. Nakamura, Y.; Masumoto, S.; Kubo, A.; Matsunaga, H.; Haginaka, J., Preparation of molecularly imprinted polymers for warfarin and coumachlor by multi-step swelling and polymerization method and their imprinting effects, *J. Chromatogr. A*, **2017**, *1516*, 71-78.
81. Zdunek, J.; Benito-Peña, E.; Linares, A.; Falcimaigne-Cordin, A.; Orellana, G.; Haupt, K.; Moreno-Bondi, M. C., Surface-imprinted nanofilaments for Europium-amplified luminescent detection of fluoroquinolone antibiotics, *Chem.-Eur. J.*, **2013**, *19* (31), 10209-10216.

82. Descalzo, A. B.; Somoza, C.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G., Luminescent core-shell imprinted nanoparticles engineered for targeted förster resonance energy transfer-based sensing, *Anal. Chem.*, **2013**, *85* (11), 5316-5320.
83. Rico-Yuste, A.; González-Vallejo, V.; Benito-Peña, E.; de las Casas Engel, T.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C., Furfural determination with disposable polymer films and smartphone-based colorimetry for beer freshness assessment, *Anal. Chem.*, **2016**, *88* (7), 3959-3966.
84. Carboni, D.; Flavin, K.; Servant, A.; Gouverneur, V.; Resmini, M., The first example of molecularly imprinted nanogels with aldolase type I activity, *Chem.-Eur. J.*, **2008**, *14* (23), 7059-7065.
85. Moreno-Bondi, M. C.; Benito-Peña, M. E.; Urraca, J. L., Orellana, G., Immunun-like assays and biomimetic microchips. In *Molecular imprinting*, Karsten, H., Ed. *Springer: USA*, **2012**, 111-164.
86. Turiel, E.; Martín-Esteban, A., Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review, *Anal. Chim. Acta*, **2010**, *668* (2), 87-99.
87. Wulff, G., Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers, *Chem. Rev.*, **2002**, *102* (1), 1-28.
88. Krupadam, R. J.; Khan, M. S.; Wate, S. R., Removal of probable human carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated water using molecularly imprinted polymer, *Water Res.*, **2010**, *44* (3), 681-688.
89. Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A., Molecularly imprinted polymers for drug delivery, *J. Chromatogr. B*, **2004**, *804* (1), 231-245.
90. Haupt, K.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors, *Chem. Rev.*, **2000**, *100* (7), 2495-2504.
91. Maria, C. M.-B.; Fernando, N.-V.; Elena, B.-P.; Javier, L. U., Molecularly imprinted polymers as selective recognition elements in optical sensing, *Curr. Anal. Chem.*, **2008**, *4* (4), 316-340.
92. Baggiani, C.; Anfossi, L.; Giovannoli, C., MIP-based immunoassays: state of the art, limitations and perspectives. In *Molecular Imprinting*, Takeuchi, T., Ed. *De Gruyter: Germany*, **2013**.
93. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F., Chemical sensors: definitions and classification, *Pure Appl. Chem.*, **1991**, *63* (9), 1247-1250.
94. Janata, J.; Josowicz, M.; DeVaney, D. M., Chemical sensors, *Anal. Chem.*, **1994**, *66* (12), 207-228.

95. Yang, G.; Zhao, F., Electrochemical sensor for chloramphenicol based on novel multiwalled carbon nanotubes@molecularly imprinted polymer, *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, *64*, 416-422.
96. Karaseva, N. A.; Pluhar, B.; Beliaeva, E. A.; Ermolaeva, T. N.; Mizaikoff, B., Synthesis and application of molecularly imprinted polymers for trypsin piezoelectric sensors, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2019**, *280*, 272-279.
97. Carrasco, S.; Benito-Peña, E.; Walt, D. R.; Moreno-Bondi, M. C., Fiber-optic array using molecularly imprinted microspheres for antibiotic analysis, *Chem. Sci.*, **2015**, *6* (5), 3139-3147.
98. Li, J.; Kendig, C. E.; Nesterov, E. E., Chemosensory performance of molecularly imprinted fluorescent conjugated polymer materials, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129* (51), 15911-15918.
99. Liu, R.; Cui, Q.; Wang, C.; Wang, X.; Yang, Y.; Li, L., Preparation of sialic acid-imprinted fluorescent conjugated nanoparticles and their application for targeted cancer cell imaging, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, *9* (3), 3006-3015.
100. Zhang, W.; Kang, J.; Li, P.; Liu, L.; Wang, H.; Tang, B., Two-photon fluorescence imaging of sialylated glycans in vivo based on a sialic acid imprinted conjugated polymer nanoprobe, *Chem. Commun.*, **2016**, *52* (97), 13991-13994.
101. Letheby, H., XXIX.—On the production of a blue substance by the electrolysis of sulphate of aniline, *J. Chem. Soc.*, **1862**, *15* (0), 161-163.
102. Dall'Olio, A.; Dascola, G.; Varacca, V.; Bocche, V., Electron paramagnetic resonance and conductivity of an electrolytic oxypyrrole [(pyrrole polymer)] black, *C. R. Acad. Sci. C*, **1968**, *267* (6), 433-435.
103. Reynolds, J. R., Pi-conjugated polymers: the importance of polymer synthesis. In *Conjugated polymers: a practical guide to synthesis*, Müllen, K, Reynolds, J. R., Masuda, T., Eds., RSC publishing: UK, **2014**, 11-78.
104. Akamatu, H.; Inokuchi, H.; Matsunaga, Y., Electrical conductivity of the perylene-bromine complex, *Nature*, **1954**, *173* (4395), 168-169.
105. Bolto, B.; McNeill, R.; Weiss, D., Electronic conduction in polymers. Electronic properties of polypyrrole, *Aust. J. Chem.*, **1963**, *16* (6), 1090-1103.
106. Berets, D. J.; Smith, D. S., Electrical properties of linear polyacetylene, *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.*, **1968**, *64* (0), 823-828.
107. Shirakawa, H.; Louis, E. J.; MacDiarmid, A. G.; Chiang, C. K.; Heeger, A. J., Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1977**, (16), 578-580.

108. Chiang, C. K.; Fincher, C. R.; Park, Y. W.; Heeger, A. J.; Shirakawa, H.; Louis, E. J.; Gau, S. C.; MacDiarmid, A. G., Electrical conductivity in doped polyacetylene, *Phys. Rev. Lett.*, **1977**, *39* (17), 1098-1101.
109. Thomas, S. W.; Joly, G. D.; Swager, T. M., Chemical sensors based on amplifying fluorescentconjugated polymers, *Chem. Revi.*, **2007**, *107* (4), 1339-1386.
110. MacDiarmid, A. G., "Synthetic metals": a novel role for organic polymers (Nobel Lecture), *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2001**, *40* (14), 2581-2590.
111. Rochat, S.; Swager, T. M., Conjugated amplifying polymers for optical sensing applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, *5* (11), 4488-4502.
112. Andrew, T. L.; Swager, T. M., Structure—property relationships for exciton transfer in conjugated polymers, *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.*, **2011**, *49* (7), 476-498.
113. Swager, T. M., The molecular wire approach to sensory signal amplification, *Accounts Chem. Res.*, **1998**, *31* (5), 201-207.
114. Zhou, Q.; Swager, T. M., Fluorescent chemosensors based on energy migration in conjugated polymers: the molecular wire approach to increased sensitivity, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (50), 12593-12602.
115. Marsella, M. J.; Carroll, P. J.; Swager, T. M., Conducting pseudopolyrotaxanes: a chemoresistive response via molecular recognition, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116* (20), 9347-9348.
116. Marsella, M. J.; Newland, R. J.; Carroll, P. J.; Swager, T. M., Ionoresistivity as a highly sensitive sensory probe: investigations of polythiophenes functionalized with calix[4]arene-based ion receptors, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117* (39), 9842-9848.
117. Marsella, M. J.; Carroll, P. J.; Swager, T. M., Design of chemoresistive sensory materials: polythiophene-based pseudopolyrotaxanes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117* (39), 9832-9841.
118. Kim, T.-H.; Swager, T. M., A fluorescent self-amplifying wavelength-responsive sensory polymer for fluoride ions, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2003**, *42* (39), 4803-4806.
119. Marsella, M. J.; Swager, T. M., Designing conducting polymer-based sensors: selective ionochromic response in crown ether-containing polythiophenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115* (25), 12214-12215.
120. Samuel, I. D. W.; Crystall, B.; Rumbles, G.; Burn, P. L.; Holmes, A. B.; Friend, R. H., The efficiency and time-dependence of luminescence from poly (p-phenylene vinylene) and derivatives, *Chem. Phys. Lett.*, **1993**, *213* (5), 472-478.
121. Zhou, Q.; Swager, T. M., Method for enhancing the sensitivity of fluorescent chemosensors: energy migration in conjugated polymers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117* (26), 7017-7018.

122. Elsenbaumer, R. L.; Shacklette, L. W., Phenylene-based conducting polymers. In *Handbook of Conducting Polymers*, 3 ed.; Dekker, M., Ed. CRC Press: USA, **2007**, 213-263.
123. Yang, J.-S.; Swager, T. M., Fluorescent porous polymer films as TNT chemosensors: electronic and structural effects, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120* (46), 11864-11873.
124. Feng, L.; Zhu, C.; Yuan, H.; Liu, L.; Lv, F.; Wang, S., Conjugated polymer nanoparticles: preparation, properties, functionalization and biological applications, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42* (16), 6620-6633.
125. Anguera, G.; Sánchez-García, D., Conjugated polymers: synthesis and applications in optoelectronics, *Afinidad*, **2014**, *71* (568), 251-262.
126. Alvarez, A.; Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A.; Salinas-Castillo, A., Fluorescent conjugated polymers for chemical and biochemical sensing, *Trends Anal. Chem.*, **2011**, *30* (9), 1513-1525.
127. Wang, Y.; Feng, L.; Wang, S., Conjugated polymer nanoparticles for imaging, cell activity regulation, and therapy, *Adv. Funct. Mater.*, *0* (0), 1806818.
128. Cheng, Y.-J.; Yang, S.-H.; Hsu, C.-S., Synthesis of conjugated polymers for organic solar cell applications, *Chem. Rev.*, **2009**, *109* (11), 5868-5923.
129. Dou, L.; Liu, Y.; Hong, Z.; Li, G.; Yang, Y., Low-bandgap near-IR conjugated polymers/molecules for organic electronics, *Chem. Rev.*, **2015**, *115* (23), 12633-12665.
130. Steppert, A.-K.; Mikosch, A.; Haraszti, T.; Göstl, R.; Kuehne, A. J. C., Reversible laser threshold modulation in dithienylethene conjugated polymer blends - a concept for q-switching in organic DFB lasers, *ACS Photonics*, **2019**, *6* (2), 558-564.
131. McQuade, D. T.; Pullen, A. E.; Swager, T. M., Conjugated polymer-based chemical sensors, *Chem. Rev.*, **2000**, *100* (7), 2537-2574.
132. Leclerc, M.; Morin, J. F., Synthetic methods for conjugated polymer and carbon materials, Wiley: USA, **2017**.
133. Kim, F. S.; Ren, G.; Jenekhe, S. A., One-dimensional nanostructures of π -conjugated molecular systems: assembly, properties, and applications from photovoltaics, sensors, and nanophotonics to nanoelectronics, *Chem. Mat.*, **2011**, *23* (3), 682-732.
134. Kim, J.; McQuade, D. T.; McHugh, S. K.; Swager, T. M., Ion-specific aggregation in conjugated polymers: highly sensitive and selective fluorescent ion chemosensors. *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2000**, *39* (21), 3868-3872.
135. Malik, A. H.; Hussain, S.; Tanwar, A. S.; Layek, S.; Trivedi, V.; Iyer, P. K., An anionic conjugated polymer as a multi-action sensor for the sensitive detection of Cu²⁺ and PPI, real-time ALP assaying and cell imaging, *Analyst*, **2015**, *140* (13), 4388-4392.

136. Zhang, W.; Li, G.; Xu, L.; Zhuo, Y.; Wan, W.; Yan, N.; He, G., 9,10-Azaboraphenanthrene-containing small molecules and conjugated polymers: synthesis and their application in chemodosimeters for the ratiometric detection of fluoride ions, *Chem. Sci.*, **2018**, 9 (19), 4444-4450.
137. Nilsson, K. P. R.; Rydberg, J.; Baltzer, L.; Inganäs, O., Self-assembly of synthetic peptides control conformation and optical properties of a zwitterionic polythiophene derivative, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100 (18), 10170.
138. Kim, I.-B.; Wilson, J. N.; Bunz, U. H. F., Mannose-substituted PPEs detect lectins: A model for Ricin sensing., *Chem. Commun.*, **2005**, (10), 1273-1275.
139. Dararatana, N.; Seidi, F.; Crespy, D., pH-sensitive polymer conjugates for anticorrosion and corrosion sensing, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10 (24), 20876-20883.
140. Ji, X.; Yao, Y.; Li, J.; Yan, X.; Huang, F., A supramolecular cross-linked conjugated polymer network for multiple fluorescent sensing, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135 (1), 74-77.
141. Darain, F.; Park, S.-U.; Shim, Y.-B., Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screen-printed electrode, *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 18 (5), 773-780.
142. Tang, Y.; Liu, Y.; Cao, A., Strategy for Sensor Based on Fluorescence Emission Red Shift of Conjugated Polymers: Applications in pH Response and Enzyme Activity Detection. *Anal. Chem.*, **2013**, 85 (2), 825-830.

Capítulo 2: Síntesis y caracterización de sucedáneos de micotoxinas y marcado fluorescente

1. OBJETIVOS	65
2. MICOTOXINAS	67
2.1. Fumonisinias	67
2.2. Citrinina	69
3. RESULTADOS	71
3.1. Síntesis del sucedáneo de la fumonisina (Mim-FumB ₁)	71
3.1.1. Bioensayos.....	77
3.2. Síntesis del sucedáneo de la citrinina y marcado fluorescente	79
3.2.1. Caracterización espectroscópica.....	83
4. BIBLIOGRAFÍA.....	86

1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este primer capítulo es la síntesis y caracterización de moléculas análogas a las micotoxinas fumonisina B₁ y citrinina para su empleo, bien como plantillas para la síntesis de polímeros con impronta molecular, bien para su etiquetado fluorescente y uso como sonda en inmunoensayos fluorescentes competitivos, además de como analito en las valoraciones por fluorescencia llevadas a cabo con las ureas indicadoras luminiscentes (bloques precursores de CLPs) descritas en el capítulo 3.

- Se plantea la síntesis de un sucedáneo de la serie de fumonisinas, en particular de la fumonisina B₁ (ver **Figura 6**). En dicha molécula se imitará la disposición de los cuatro grupos carboxílicos presentes en la micotoxina natural, cuya presencia se considera que es fundamental para el reconocimiento por anticuerpos. El sucedáneo **Mim-FumB₁** (**Figura 6**) se caracterizará estructuralmente por técnicas de RMN y MS y se comprobará su idoneidad como análogo molecular de la micotoxina mediante un bioensayo competitivo de fluorescencia, comparando la respuesta frente a la propia fumonisina B₁.

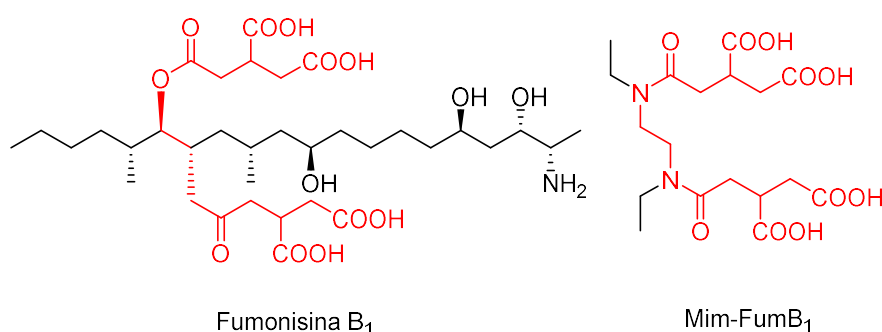


Figura 6. Estructura de la fumonisina B₁ y del sucedáneo molecular propuesto Mim-FumB₁. En rojo se resalta las principales similitudes entre las dos moléculas.

- Por otra parte, se abordará la preparación de análogos de citrinina: i) Partiendo del ácido 4-aminosalicílico se llevará a cabo una reacción de amidación para la obtención del derivado **AVA-ASA** (**Figura 7**) que será empleado como plantilla molecular para la elaboración de MIPs en formato de nanogel; ii) **AVA-ASA** se derivatizará con un colorante tipo BODIPY comercial con una fluorescencia muy intensa para su empleo como sonda en ensayos competitivos de fluorescencia. Tanto **AVA-ASA** como su derivado fluorescente **BODIPY-AVA-ASA** (**Figura 7**) se caracterizarán estructuralmente con técnicas de RMN y MS. La sonda fluorescente se caracterizará además mediante técnicas espectroscópicas de absorción UV-Vis y fluorescencia.

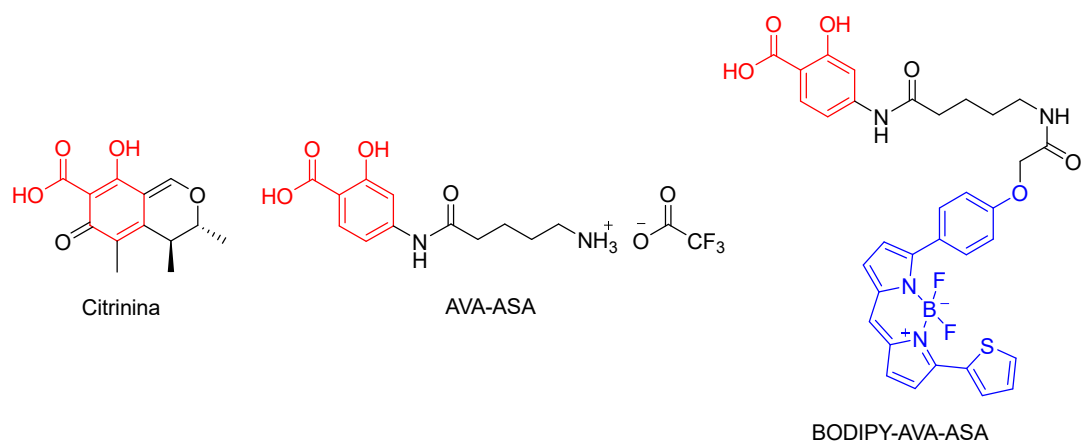


Figura 7. Estructura química de la micotoxina citrinina y dos análogos propuestos: AVA-ASA como plantilla molecular para la síntesis de MIPs, y BODIPY-AVA-ASA como sonda fluorescente. En rojo se resalta la similitud entre las estructuras químicas (el anillo bencénico *orto*- sustituido con un grupo ácido carboxílico y un hidroxilo) y, en azul, el fluoróforo BODIPY.

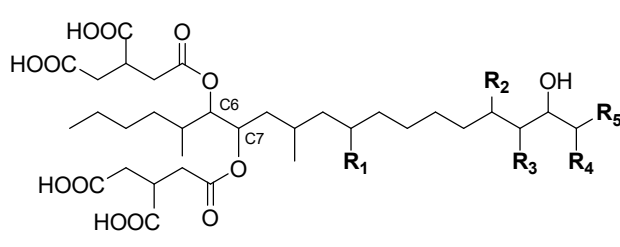
2. MICOTOXINAS

Como ya se ha comentado en la Introducción de la Tesis, las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos.¹ Se trata de productos naturales cuyo peso molecular está alrededor de los 700 g/mol y pueden encontrarse en productos vegetales como cereales y especias o productos de origen animal como leche y huevos.² Dependiendo de la forma y tiempo de contacto, así como de la dosis, el efecto de éstas en humanos o animales puede variar desde una simple erupción cutánea hasta causar la muerte.³

De las más de 400 micotoxinas conocidas, sólo 30 de ellas son consideradas como una amenaza para el ser humano.² En esta Tesis se ha considerado trabajar con dos de ellas, fumonisina B₁ y citrinina por su relevancia tal y como se describe en los siguientes apartados. Ambas micotoxinas poseen uno o más grupos ácido carboxílico en su estructura que pueden emplearse para el reconocimiento molecular.

2.1. Fumonisininas

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas que se caracterizan por presentar una larga cadena hidrocarbonada hidroxilada a la que se agrega el ácido tricarbálico. Dependiendo de la serie a la que pertenezca, la fumonisina puede presentar además grupos metilo, amino, acetamido o hidroxipiridinio.⁴ Así, las 28 fumonisinas que se han descrito hasta el momento, se encuentran divididas en 4 series (A, B, C y P).⁵ En la **Figura 8** se muestra la estructura general de los distintos tipos de fumonisinas, siendo la fumonisina B₁ (FB₁) la más abundante.^{6, 7} Las fumonisinas de la serie A se caracterizan por la presencia del grupo acetamida, las series B y C por el grupo amino, con la diferencia de que las fumonisinas tipo C presentan un carbono menos en la cadena alquílica, y las fumonisinas de la serie P por contener el sustituyente 3-hidroxipiridinio. El intercambio en las posiciones R₁, R₂ y R₃ entre hidrógenos e hidroxilos, así como la hidrólisis total o parcial de alguno de los ácidos tricarbálicos acaban constituyendo cada una de las series.⁵



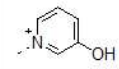
Fumonisinina	R ₁ = R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
FA ₁	-OH	-H	-NHCOCH ₃	-CH ₃
FB ₁	-OH	-H	-NH ₂	-CH ₃
FC ₁	-OH	-H	-NH ₂	-H
FP ₁	-OH	-H		-CH ₃

Figura 8. Clasificación estructural de los tipos más relevantes de fumonisinas (FA₁, FB₁, FC₁ y FP₁).

En 1970 se aisló por primera vez una cepa del *Fusarium Verticillioides* de una muestra de maíz mohoso de la que se pensaba que era la causante de un brote de leucoencefalomalacia (enfermedad causada por la FB₁) en caballos.⁸ Pero no fue hasta marzo de 1988 cuando se aisló por primera vez la FB₁⁹ y, unos meses después, cuando se elucidó su estructura completa.¹⁰ A diferencia de la mayoría de micotoxinas, solubles en disolventes orgánicos, la presencia de los grupos carboxilo, amino, hidroxilo y/o acetamido dotan a las fumonisinas de una naturaleza hidrofílica, lo que podría ser responsable de su tardío descubrimiento¹¹ y de que todavía pueda haber micotoxinas de la misma familia por descubrir.⁷

Las fumonisinas son producidas por una gran variedad de hongos (se han podido determinar hasta 15 especies de *Fusarium* como productoras de fumonisinas y alguna variedad del *Aspergillus*),¹² siendo las micotoxinas pertenecientes a la serie B las más predominantes⁵ y, particularmente, la FB₁. El porcentaje de FB₁ se estima entre un 70 y un 80 % en los cultivos de maíz contaminados por estas micotoxinas, mientras que para el resto de series este porcentaje suele ser menor al 5 %.⁵

Las fumonisinas se encuentran en una gran variedad de productos, mayoritariamente en el maíz, pero también en cerveza, arroz, sorgo, triticale (cereal producido al hibridar trigo con centeno), alubias y espárragos entre otros,⁶ causando diferentes enfermedades. Entre las más destacadas cabe citar la leucoencefalomalacia y la duodenitis/yeyunitis proximal que afectan a los caballos, el edema pulmonar porcino y el síndrome de mortalidad aguda que afecta principalmente a los pollos de engorde.¹³ Además, también se ha demostrado que las fumonisinas poseen efectos cancerígenos, hepatotóxicos, nefrotóxicos y embriotóxicos en animales de laboratorio.¹⁴ En humanos están relacionadas con defectos en el tubo neural y el cáncer esofágico,⁶ y fueron clasificadas en 1993 como grupo 2B (probablemente carcinogénico) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC),^{5, 7} de ahí el gran número de publicaciones que se pueden encontrar para la determinación y cuantificación de la fumonisina, especialmente la FB₁, en maíz. El mecanismo de toxicidad de la FB₁ se basa en la inhibición de la biosíntesis de los esfingolípidos, que desempeñan un papel muy importante en la formación de membranas biológicas, siendo un regulador celular vital. En consecuencia, dicha interrupción puede causar el fallo de diferentes órganos.¹⁵

La HPLC-FL (cromatografía líquida de altas prestaciones acoplada a un detector de fluorescencia) es uno de los métodos analíticos más empleados para la detección de fumonisinas.^{16, 17} Pese a que estas micotoxinas no presentan fluorescencia, se han investigado diferentes reactivos para su derivatización fluorescente¹⁸ como la fluorescamina,¹⁹ —que se descartó porque producía un

subproducto fluorescente—, o el *o*-ftaldialdehído junto con el 2-mercaptoetanol, con los que se llegaron a obtener límites de detección por debajo de 50 ng/g,¹⁷ aunque la estabilidad del producto fluorescente formado era reducida.¹⁸ Otros ejemplos son el naftaleno-2,3-dicarboxaldehído con KCN y el cloroformiato de 9-fluorenilmetilo, que originan productos estables muy fluorescentes.²⁰ Otros métodos de análisis se basan en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), pero son menos utilizados ya que requieren múltiples pasos de tratamiento como hidrólisis, limpieza y derivatización de la muestra antes del análisis, además de precisar equipos más sofisticados.¹⁸ Otros métodos más sencillos pero que presentan unos límites de detección más elevados son los basados en la cromatografía en capa fina, que requieren el uso de reveladores químicos (se ha podido optimizar el método llegando a obtener límites de detección de 100 ng/g).²¹ Métodos menos frecuentes son la electroforesis capilar o los inmunoensayos.^{11, 18}

Diecinueve de los veintiocho análogos de la fumonisina que se conocen hasta el momento, incluida la más abundante, la FB₁, poseen en los carbonos C6 y C7 (**Figura 8**) el ácido tricarbálico unido a la cadena principal en forma de éster y, de los nueve restantes, sólo dos no poseen ningún éster del ácido tricarbálico.²² Partiendo de esta premisa y observando que en bibliografía los escasos MIPs descritos para fumonisinas, —normalmente para preconcentración de muestras—, se basan en la interacción de los grupos carboxílicos con el monómero funcional (fosfato de metacrilato de etilenglicol,²³ *N,N*-dietilaminoetilmetacrilato,^{23, 24} ácido metacrílico,²⁵ o metacrilato de sodio²⁶) a través de enlaces de hidrógeno y/o ácido-base, se decidió proceder a la síntesis del sucedáneo **Mim-FumB₁** mostrado en la **Figura 6**.

2.2. Citrinina

La citrinina o ácido (3*R*,4*S*)-4,6-dihidro-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3*H*-2-benzopirán-7-carboxílico²⁷ es un compuesto orgánico que contiene un ciclohexadieno con un carbonilo y un grupo metileno exocíclico.²² A temperatura ambiente este análogo de la quinona se encuentra en estado sólido en forma de pequeños cristales de color amarillo formados por dos tautómeros (**Figura 9**).²⁸ La citrinina se encuentra presente contaminando diferentes productos agrícolas como el arroz, el trigo, la avena, el centeno, el maíz y la cebada. Otras fuentes incluyen habichuelas, frutas, zumos de frutas y vegetales, cervezas, hierbas y especias, productos lácteos o incluso en leche materna humana.^{7, 29}

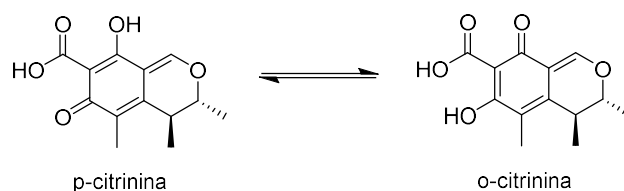


Figura 9. Representación de los tautómeros de la citrinina.

La citrinina fue aislada por primera vez a partir de un cultivo de *Penicillium citrinum* en 1931 por Raistrick y Hetherington³⁰ durante la búsqueda de nuevos productos naturales que pudiesen actuar como antibióticos. Debido a su toxicidad en vertebrados, la citrinina no se pudo aplicar para tal fin. Aun así, se continúa con la investigación de esta micotoxina y sus derivados debido a que, en bajas concentraciones, al igual que ciertas micotoxinas, presenta propiedades antibióticas, bactericidas, antifúngicas y antiprotozarias,²⁸ e incluso se han encontrado pruebas de que podría actuar como agente anticancerígeno³¹ y neuroprotector.^{32, 33} Además de por el *P. citrinum*, la citrinina también puede ser producida por otras variedades de *Penicillium* como el *P. expansum*, el *P. camemberti* y el *P. viridicatum*, y otras especies como el *Aspergillus* (*A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae* y *A. terreus*) y el *Monascus* (*M. ruber*, *M. purpureus*).³⁴ Se suele encontrar junto con la ocratoxina A,³⁵ y con otros tipos de ocratoxinas, aflatoxinas, fumonisinas, ácido 3-nitropropiónico, zearalenona, alcaloides del cornezuelo del centeno y tricotecenos. La citrinina es de las micotoxinas más frecuentes y con los efectos más nocivos para animales y humanos.²

En cuanto a la toxicidad de la citrinina, se han llevado a cabo diferentes estudios y, aunque no se conoce el mecanismo, sí se han podido determinar sus efectos nefrotóxicos, fetotóxicos y embriocidas (otros como la genotoxicidad todavía causan controversia).^{35, 36} La dosis media letal varía significativamente con la especie en estudio, tal y como muestra un trabajo realizado por Hanika y Carlton³⁷ en el que se determinó que la dosis media letal para patos era de 57 mg/kg, para pollos 95 mg/kg y 134 mg/kg para conejos. Pese a esto, todavía no existe una legislación específica para regular los límites máximos permitidos para cada una de las matrices donde la citrinina se puede hallar.^{32, 35, 38}

Los métodos de determinación y cuantificación de citrinina se han basado en sus propiedades ópticas. Esta micotoxina presenta máximos de absorción a 250 nm ($\epsilon = 918 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 333 nm ($\epsilon = 907 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en metanol³⁹ y un máximo de emisión alrededor de 510 nm en acetonitrilo, 2-propanol o THF.⁴⁰ Gracias a sus propiedades luminiscentes y a su fácil separación, la cromatografía en capa fina (CCF) fue la técnica más utilizada para su determinación en la década de los 80. Después de tratarla con diferentes reveladores, se cuantificaba su emisión bajo una lámpara de 365 nm.^{22, 41} Pese a la facilidad de este método, las desventajas que presentaba como

son la dificultad de su automatización, la subjetividad de la medida y, sobre todo, la baja sensibilidad ($15\text{-}20\text{ }\mu\text{g/kg}$)⁴² hizo que se desestimara este método y se pasase a usar otros muchos más sensibles.²² Actualmente los métodos más empleados se basan en la técnica HPLC acoplada a diferentes tipos de detectores,²² desde los más simples basados en sus propiedades ópticas, ya sean detectores de UV-Vis⁴³ o de fluorescencia (mucho más sensible) alcanzando límites de detección de 0.1 ng/g ,⁴⁴ hasta los detectores de masas con unos límites de cuantificación de 20 ng/g .⁴⁵ Otros métodos también empleados son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, o los bioensayos.² Estos últimos simplifican la tarea de extracción de la muestra, minimizan la cantidad de disolvente empleado, disminuyen la pérdida de muestra durante el análisis y aumentan la sensibilidad y selectividad del mismo, por lo que se presentan como una alternativa a los métodos de detección fisicoquímicos mencionados anteriormente.^{2, 22}

En bibliografía podemos encontrar algunas publicaciones que describen la preparación de MIPs para citrinina, aunque únicamente se emplean para preconcentración de muestras. En la mayoría de los casos se emplea como plantilla el ácido 3-hidroxi-2-naftoico en lugar de la propia micotoxina,⁴⁶⁻⁴⁸ ya que éste imita tanto la estructura aromática, como los grupos ácido -COOH y fenólico (Figura 10) que son los más relevantes para la interacción de la molécula con el monómero funcional correspondiente. En nuestro caso, y teniendo en cuenta la necesidad de disponer de un grupo -NH₂ libre para posteriores derivatizaciones, no fue posible el empleo de un amino derivado del ácido 3-hidroxi-2-naftoico. Como alternativa se planteó el uso del ácido 4-aminosalicílico. A pesar de que el ácido 4-aminosalicílico cuenta con un anillo aromático menos, sigue poseyendo los sustituyentes -COOH y -OH en una disposición *orto*- en el anillo bencénico y es una molécula disponible comercialmente a bajo coste.

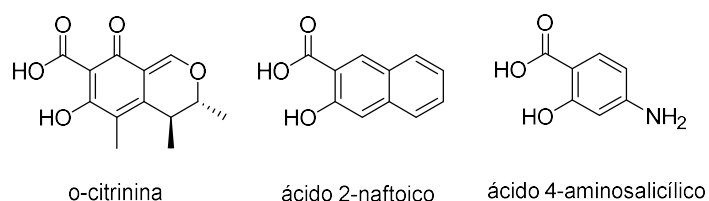


Figura 10. Comparación de la estructura química de la *o*-citrinina con los análogos moleculares ác. 2-naftoico y ác. 4-aminosalicílico propuestos como plantilla para la síntesis de MIPs selectivos a *o*-citrinina.

3. RESULTADOS

3.1. Síntesis del sucedáneo de la fumonisina (Mim-FumB₁)

La síntesis de **Mim-FumB₁** se realizó adaptando el trabajo descrito por Elgazwy⁴⁹ en una ruta de cuatros pasos sintéticos con un rendimiento global del 45 % (Figura 11).

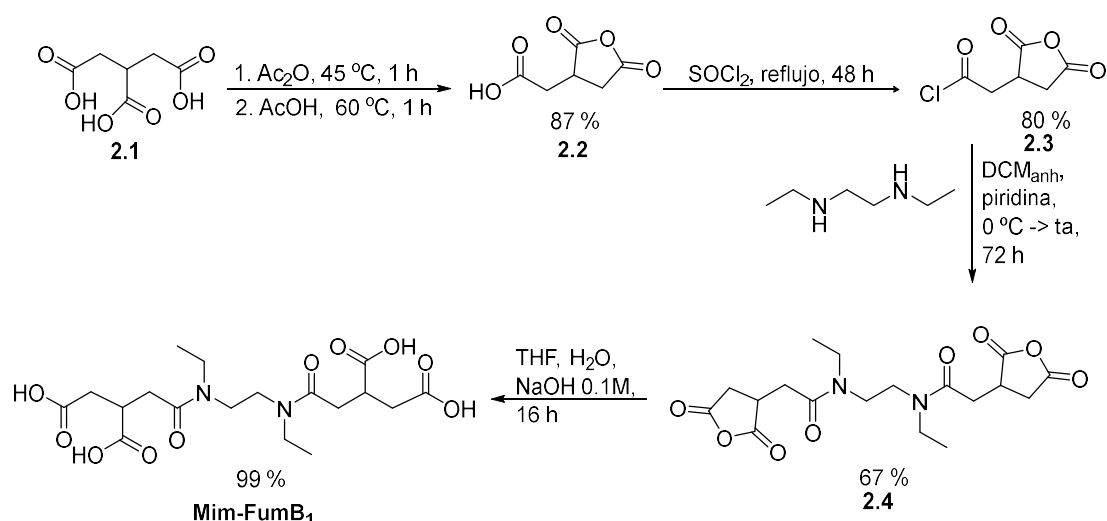


Figura 11. Procedimiento para la síntesis del sucedáneo de la fumonisina B₁ y análogos.

Para la obtención del sucedáneo propuesto partiendo del ácido tricarbálico (**2.1**, **Figura 11**) era necesaria la reacción de uno de los tres ácidos carboxílicos con una diamina secundaria (la *N,N'*-dietil-1,2-etanodiamina), sin que los otros dos grupos ácidos se viesen afectados. Esta reacción, así como la protección selectiva de dos de los grupos no se podía llevar a cabo, ya que los tres grupos ácidos son idénticos. Se optó así por una reacción de dos pasos sin aislamiento del intermedio (*"in-one-pot"*), cuyo mecanismo se describe en la **Figura 12**. En primer lugar, a partir del anhídrido acético se forma el anhídrido de uno de los grupos ácidos del ácido tricarbálico, aumentando así su electrofilia. Finalmente tiene lugar una ciclación intramolecular con la eliminación de una molécula de ácido acético formando un anillo estable de 5 miembros (anhídrido succínico).

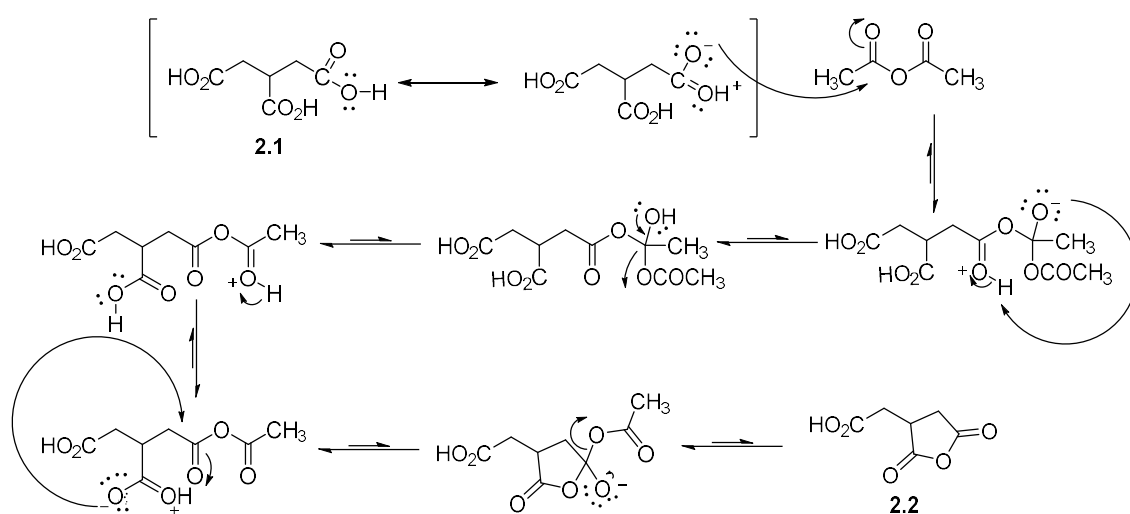


Figura 12. Mecanismo de la reacción de protección del ácido tricarbálico.

Para la obtención del anhídrido succínico (**2.2, Figura 11**), Elgazwy propone una ruta alternativa a la seguida en nuestro trabajo. En su caso, la adición del anhídrido acético se realiza a temperatura ambiente, se emplean tiempos de reacción más largos (24 h en lugar de 1 + 1 h en nuestro protocolo), y no es necesaria la adición posterior de ácido acético, reportando un 78 % de rendimiento. En nuestro caso, sin embargo, fue necesario un aumento de temperatura (a 45 °C primero y 60 °C después) y adición del ácido acético en un segundo paso para poder obtener la molécula deseada.

Una vez protegido el ácido tricarbálico, se procede a la reacción entre el grupo ácido carboxílico libre de la molécula y la *N,N'*-dietil-1,2-etanodiamina. Al tratarse de una amina secundaria, la nucleofilia de ésta se ve reducida en comparación de las aminas primarias, menos impedidas estéricamente, por lo que se hace necesario aumentar la electrofilia del grupo carboxilo. En este caso se optó por la formación del cloruro de acilo, en lugar de emplear agentes activantes tipo carbodimida o triazol, ya que la reactividad del primero es mayor. Una vez obtenido el cloruro de acilo hay que tener especial precaución con su almacenamiento ya que, al ser tan reactivo, el proceso puede revertir a la molécula inicial. Por ello, es necesario llevar a sequedad el matraz de reacción y guardarlo en un desecador.

Para la obtención de la amida **2.4 (Figura 11)**, se adiciona gota a gota una disolución en DCM anhidro de la *N,N'*-dietil-1,2-etanodiamina sobre el cloruro de ácido **2.3** disuelto en idéntico disolvente y enfriado en un baño de hielo. Hay que asegurarse que no existan trazas de agua en el medio de reacción para evitar la posible apertura del ciclo. Una vez completada la adición, la reacción se completa a temperatura ambiente. Debido a que no fue posible seguir la reacción por CCF, se dejó reaccionar un tiempo que se consideró suficiente (48 h); pruebas posteriores demostraron que a tiempos inferiores queda material de partida sin reaccionar y a tiempos más largos el anhídrido succínico se abre, aumentando su solubilidad en disolventes acuosos con lo que acaba perdiéndose parte del producto en el proceso de aislamiento.

El último paso para la síntesis del sucedáneo de las fumonisinas (**Mim-FumB₁**) consiste en la apertura del anhídrido mediante hidrólisis ácida (**Figura 11**), teniendo la precaución de no provocar la hidrólisis del grupo amida. Se optó por la apertura en medio ácido y no básico por la mayor estabilidad de las amidas en este medio. Sin embargo, el empleo de HCl 2 M a 90 °C durante más de 24 h no dio ningún resultado. Se probó entonces con hidrólisis básica empleando una disolución acuosa de NaOH 0.01 M sin éxito. Finalmente, se consiguió la hidrólisis del anhídrido, sin afectar al grupo amida, empleando NaOH 0.1 M a temperatura ambiente durante 16 h. Como se describe en la **Figura 13**, el mecanismo de reacción consiste en una primera etapa

de adición nucleófila del OH^- al grupo carbonilo del anhídrido succínico; tras la apertura del ciclo y la protonación del carboxilato en una segunda etapa, se obtiene el producto deseado **Mim-FumB₁**.

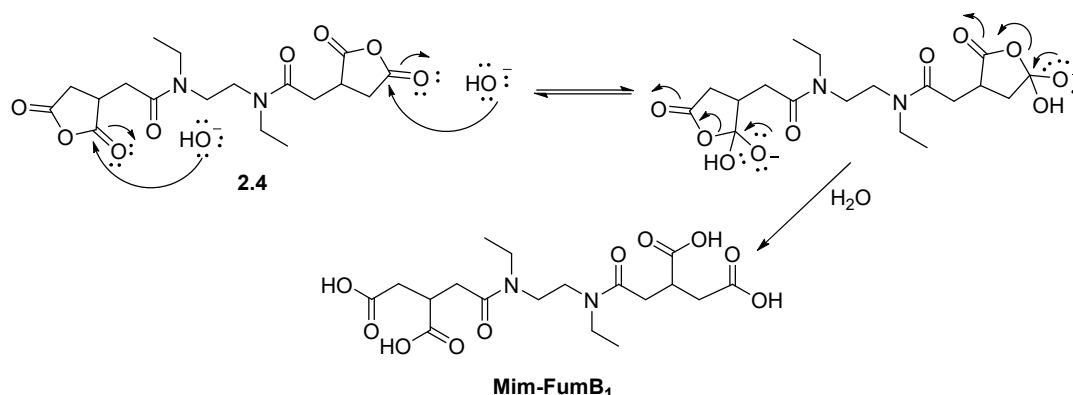


Figura 13. Mecanismo de la apertura del anillo succínico en la molécula 2.4 para la formación del Mim-FumB₁ en medio básico.

Al igual que en el caso de las fumonisinas, la presencia de los 4 grupos ácido carboxílico en el sucedáneo **Mim-FumB₁** favorece su solubilidad en agua, lo que impidió aislar el producto mediante extracción líquido-líquido en un disolvente orgánico, ni si quiera modificando el pH de la disolución acuosa. Finalmente, se optó por neutralizar el medio y evaporar todo el disolvente. Después de secar la muestra en una estufa de vacío durante más de 48 h, se realizó un microanálisis elemental para determinar el porcentaje en peso de sucedáneo, ya que contenía cantidades importantes de NaCl debido a los distintos pasos de neutralización con HCl (más de un 65 % en peso). Debido a que no fue posible la eliminación del exceso de NaCl, se decidió emplear la molécula sucedánea de FumB₁ en esta forma para aplicaciones posteriores (como plantilla en la síntesis de MIPs para fumonisina, o como analito en bioensayos), teniendo en cuenta que, según los resultados del microanálisis, el porcentaje en peso de **Mim-FumB₁** no superaba el 35 % del total. Desafortunadamente, la poca solubilidad en disolventes orgánicos como el acetonitrilo, incluso de la forma completamente protonada (debido, probablemente a la asociación intermolecular de los grupos carboxilo), impidió el uso de **Mim-FumB₁** en las valoraciones espectroscópicas llevadas a cabo con las ureas fluorescentes del capítulo 3 de esta Tesis.

La caracterización por ^1H -RMN y MS confirmó la estructura química de **Mim-FumB₁**. Pese a parecer una molécula sencilla, la formación (racémica) de un centro estereogénico provoca el desdoblamiento de todas las señales de ^1H -RMN por tratarse de protones diastereotópicos, hecho que se observó desde la formación del compuesto **2.2** y cuyo espectro de ^1H -RMN se muestra en la **Figura 14** a modo de ejemplo.

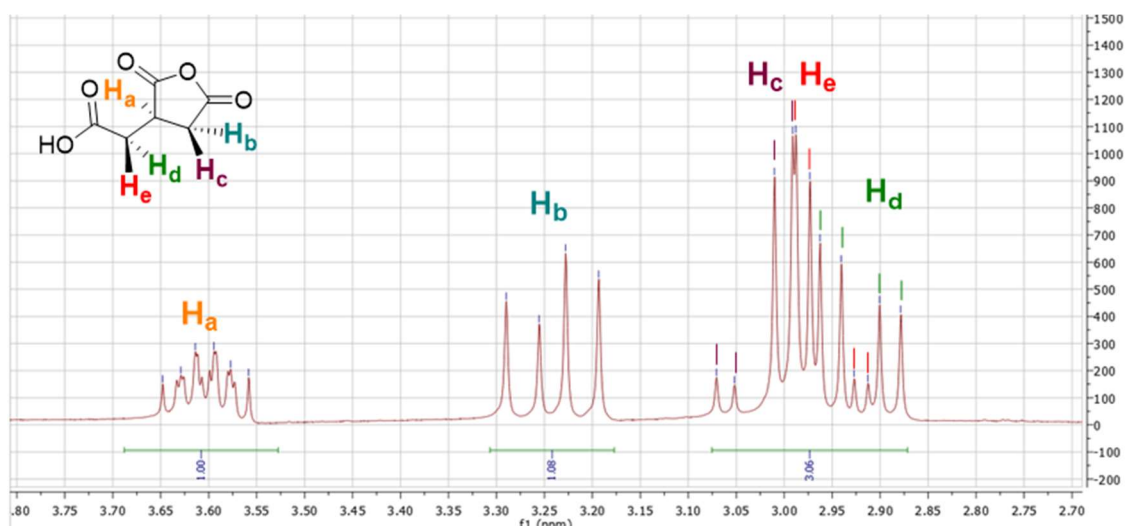


Figura 14. ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico (1,2-anhídrido) racémico (2.2).

En el caso de **Mim-FumB₁**, las señales de los protones diastereotópicos aparecen muy próximas entre sí como multipletes que no se pudieron asignar. Aun así, se pudo comprobar que las integrales se correspondían con la molécula esperada. Empleando como referencia las dos señales cuádrupletes correspondiente a los dos CH_3 , que integran por 6 H, se comprobó que el resto de señales sumaban los 18 H restantes de la molécula -excluyendo los protones ácidos- (**Figura 15a**). El ^{13}C -RMN (**Figura 15b**) resultó mucho más sencillo y clarificador. Se observan claramente los carbonos correspondientes a los tres carbonilos diferentes de la molécula ($\delta > 170$ ppm) y los CH_3 a 13 ppm. También se pudieron contabilizar los 5 C restantes de la molécula. Por espectrometría de masas se detectó el ion molecular correspondiente a la molécula deseada $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (455.2) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{10}^- \text{Na}^+$ (encontrado a 455.2). También se observan otros dos picos correspondientes al producto de monodesprotonación de uno de los $-\text{COOH}$ ($[\text{M}+2\text{Na}]^+$ 477.2) y de doble desprotonación ($[\text{M}+3\text{Na}]^+$ 499.2).

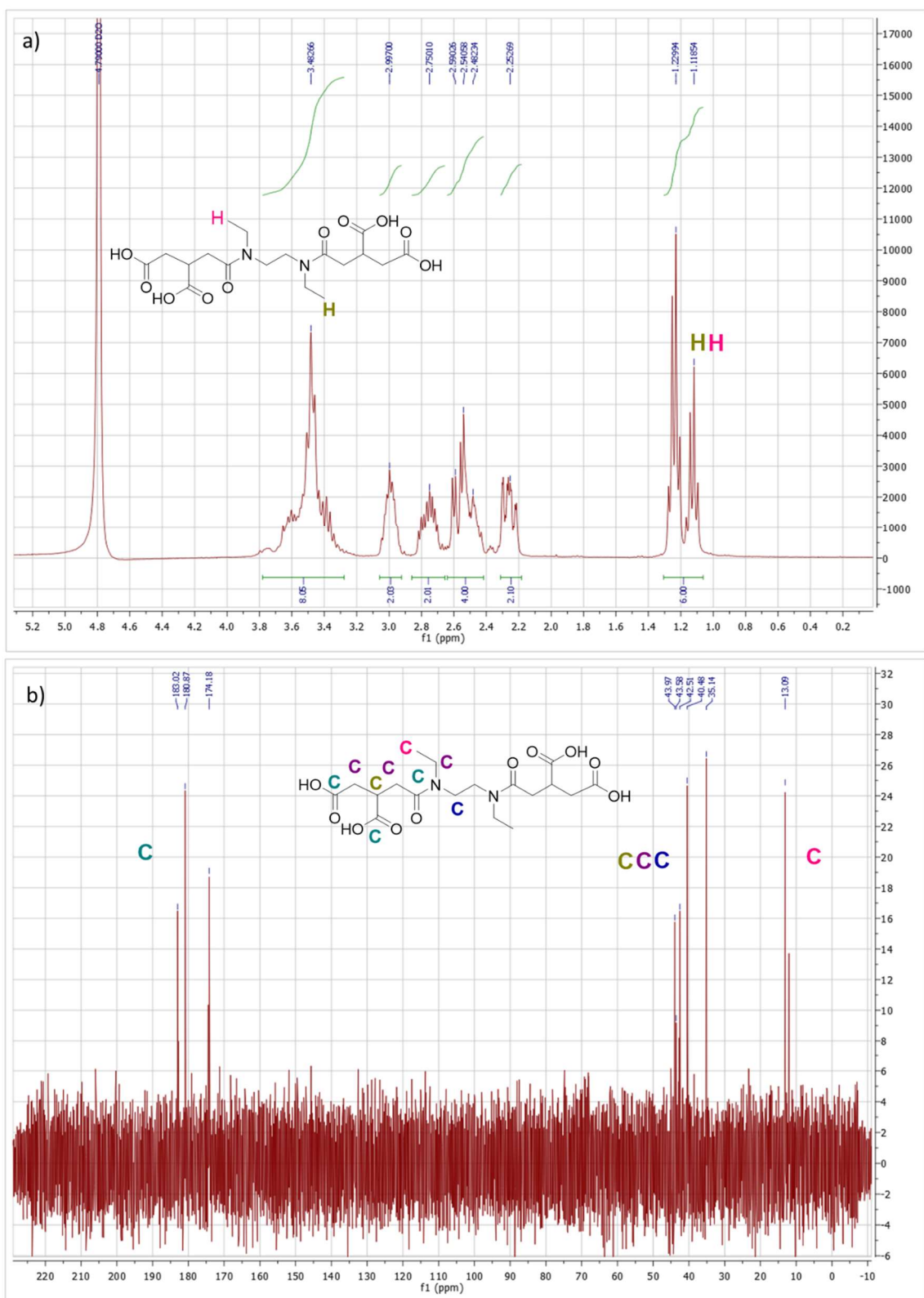


Figura 15. a) ^1H -RMN (300 MHz, D_2O) y b) ^{13}C -RMN (75 MHz, D_2O) del sucedáneo de fumonisina N,N' -(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahidrofuran-3-il)- N -etilacetamida (Mim-FumB₁).

3.1.1. Bioensayos

Con el fin de comprobar el potencial de **Mim-FumB₁** como sucedáneo de fumonisina B₁, se llevó a cabo un inmunoensayo competitivo de fluorescencia. Dicho fluoroinmunoensayo para el análisis de fumonisina B₁ fue llevado a cabo por la Dra. R. Peltomaa de nuestro Grupo de investigación. El inmunoensayo para la toxina había sido desarrollado y optimizado previamente como parte del trabajo de su Tesis Doctoral (2019) y se encuentra descrito en la ref. ⁵⁰.

El inmunoensayo consiste en el empleo de nanopartículas de oro de 17 nm de diámetro (determinado por microscopía electrónica de transmisión) funcionalizadas con proteína G. La proteína G se emplea para inmovilizar un anticuerpo anti-fumonisina B₁ en la superficie de las nanopartículas. Las nanopartículas de oro fueron sintetizadas en el Grupo de investigación siguiendo el procedimiento descrito en un trabajo anterior.⁵⁰

Por otra parte, se diseña un mimotopo (MMTP), –macromolécula que imita a un epítipo o parte del antígeno que es reconocida por el anticuerpo–, derivatizado con proteína fluorescente en el amarillo (YFP, *yellow fluorescent protein*). Cuando la macromolécula MMTP-YFP se encuentra unida al anticuerpo, la fluorescencia de la YFP está desactivada debido a la proximidad de las nanopartículas de oro. El fenómeno de desactivación de la fluorescencia por las NPAu se ha atribuido en la bibliografía a varios mecanismos, incluida la transferencia de energía de resonancia Förster (FRET), la transferencia de energía a la superficie del metal nanoparticulado (NSET) y la transferencia de energía de partículas de dipolo a metal (DMPET). En el trabajo realizado por Peltomaa *et al.*,⁵⁰ la desactivación de la fluorescencia se debe a un proceso de transferencia de energía en superficie (SET) entre el fluoróforo (YFP) y las NPAu, como quedó demostrado a través de medidas de emisión de fluorescencia en el estado estacionario y de tiempos de vida de fluorescencia. Se probaron otros tamaños de partícula mayores (36 nm y 72 nm), llegando a la conclusión que la transferencia de energía en superficie dependía del tamaño de las NPAu y esta era más eficaz para las nanopartículas de menor tamaño, las de 17 nm, por lo que fueron las que se seleccionaron para el ensayo final.

Al añadir el analito, ya sea la fumonisina B₁ o su sucedáneo **Mim-FumB₁**, se produce una competición por el sitio de unión al anticuerpo entre el analito y la MMTP-YFP de manera que, a mayor concentración de analito, menor es la cantidad de MMTP-YFP enlazada a las NPs. Esto último se traduce en un aumento de la fluorescencia a medida que aumenta la concentración de la micotoxina (o de su sucedáneo). En la **Figura 16** (adaptada de la ref.⁵⁰) se muestra un esquema del bioensayo descrito.

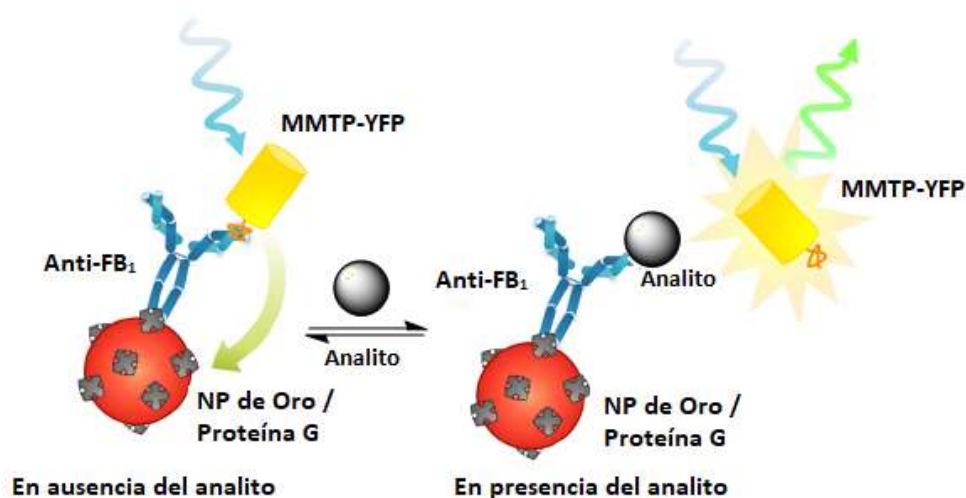


Figura 16. Representación esquemática del inmunoensayo homogéneo competitivo basado en el empleo de una sonda mimotopo de fumonisina B₁ marcada con el fluoróforo YFP, y el elemento de reconocimiento anticuerpo anti-FB₁ inmovilizado en nanopartículas de oro a través de un enlace con proteína G. Si el mimotopo-YFP se encuentra unido al anticuerpo, la NP de oro desactiva eficazmente la fluorescencia intrínseca de la YFP. En presencia del analito, se inhibe la unión del mimotopo-YFP a las NPs, lo que se traduce en una activación de la fluorescencia.

Para la realización del bioensayo se empleó una placa de 96 micropocillos y un lector de fluorescencia para microplacas (ver detalles en la Parte Experimental). Manteniendo un volumen constante de 60 μL en cada pocillo, las concentraciones finales de anticuerpo anti-FB₁, MMTP-YFP y NPAu-proteínaG se ajustaron a 1.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y 1 nM, respectivamente, variando únicamente la concentración final de los analitos (entre 0.4–425 nM para FB₁ y 1.7–1735 μM para **Mim-FumFB₁**). La muestra se excitó a 500 nm y se recogió la emisión a 545 nm. Cada medida se realizó por triplicado y las curvas de valoración se muestran en la **Figura 17**.

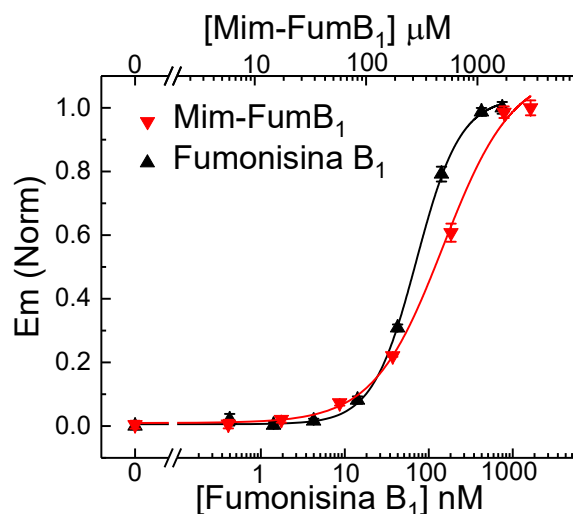


Figura 17. Comparación de la respuesta de activación de la señal de fluorescencia de la YFP a concentraciones crecientes de analito. Negro: fumonisina B₁. Rojo: Sucedáneo sintetizado Mim-FumB₁. (λ_{exc} 500 nm, λ_{em} 545 nm)

Según estos resultados, se puede concluir que el sucedáneo es reconocido de forma efectiva por anticuerpos específicos de fumonisina. Tal y como es de esperar, las cantidades que se han de emplear en el ensayo con el sucedáneo son 3 órdenes de magnitud superiores a las de la micotoxina natural, ya que no es posible competir con el propio reconocimiento antígeno-anticuerpo cuando este último ha sido obtenido en presencia de la micotoxina auténtica. Aun así, son resultados muy prometedores que confirman que el candidato elegido en esta Tesis para imitar a la fumonisina B₁ como plantilla en la síntesis de MIPs, presenta grupos funcionales en número y distribución apropiada para crear cavidades de unión para el reconocimiento de fumonisina B₁. La finalidad de la síntesis de **Mim-FumB₁** era la obtención de un análogo que se pudiese preparar con un *bajo coste* para su empleo como plantilla en la elaboración de MIPs selectivos para fumonisinas. Para la síntesis de estos polímeros se requieren normalmente cantidades importantes de molécula plantilla, algo que sería impracticable con las propias fumonisinas (por ejemplo, el precio de 10 mg de fumonisina B₁ de *F. moniliforme* en Sigma-Aldrich en 2019 es de 1200 euros, mientras que el precio calculado, de forma aproximada, para el coste de 10 mg del sucedáneo es de 7 €).

3.2. Síntesis del sucedáneo de la citrinina y marcado fluorescente

En este trabajo se propone el uso del ácido 4-aminosalicílico como sucedáneo molecular de la citrinina por varias razones: i) la analogía estructural con la micotoxina por poseer sustituyentes -COOH y -OH en una disposición *orto*- en el anillo bencénico, ii) la disponibilidad comercial a un precio asequible y, iii) la presencia de un grupo -NH₂ libre que permite la modificación química de la molécula. El principal interés es obtener un derivado del ácido 4-aminosalicílico que posea un espaciador alifático de longitud suficiente con un grupo NH₂ terminal (sucedáneo **AVA-ASA**, ver **Figura 7**) que permita:

- Su anclaje covalente sobre microesferas de vidrio silanizadas. Este anclaje es necesario para la preparación de MIPs en formato de nanogel.⁵¹ Se ha optado por introducir un espaciador de al menos 5 átomos de C para que la plantilla quede lo suficientemente separada de la superficie del vidrio y permita así la creación de cavidades en el MIP. Espaciadores mucho más largos tampoco son convenientes ya que la cadena carbonada podría plegarse sobre sí misma.
- El marcado con un fluoróforo tipo BODIPY para la obtención de un derivado fluorescente del sucedáneo (**BODIPY-AVA-ASA**, **Figura 7**) que pueda emplearse como sonda en ensayos competitivos por fluorescencia para la determinación de citrinina.

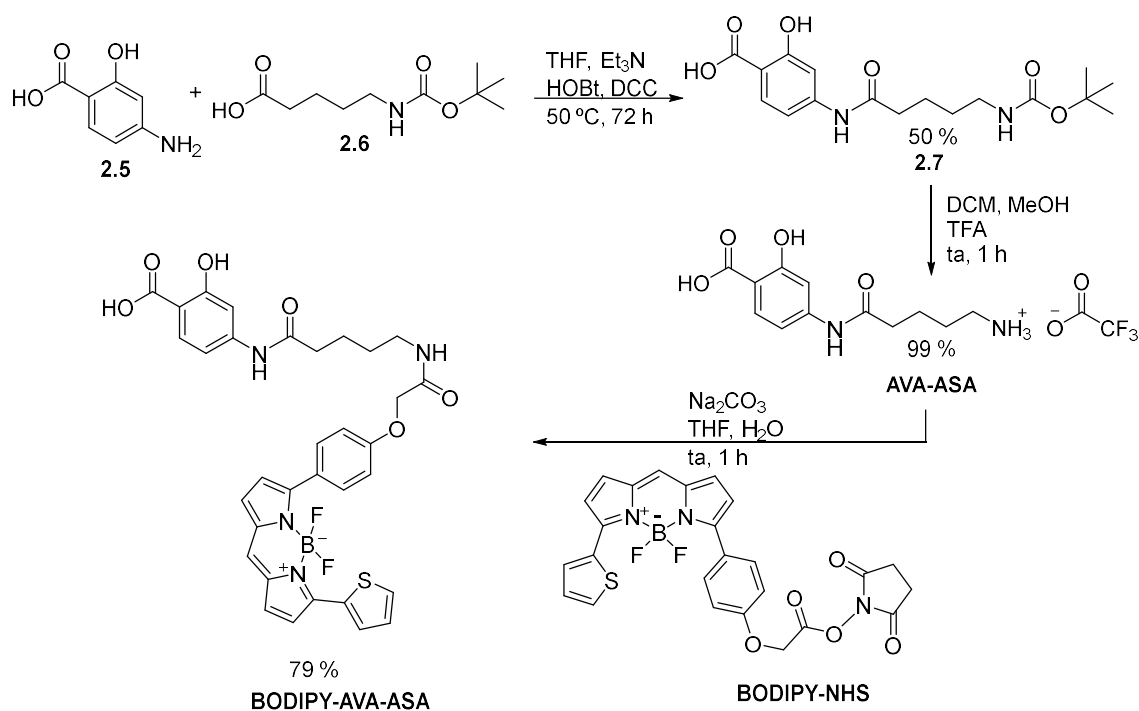


Figura 18. Síntesis en tres pasos para la obtención del sucedáneo fluorescente de citrinina, BODIPY-AVA-ASA, a partir del ácido 4-aminosalicílico.

El primer paso de la síntesis del sucedáneo **AVA-ASA** consiste en la reacción entre el grupo amino del ácido 4-aminosalicílico y el grupo -COOH del ácido 5-(Boc-amino)pentanoico, (**2.5** y **2.6**, **Figura 18**). Debido al pobre carácter nucleófilo de la amina aromática del ácido 4-aminosalicílico, se consideró en primer lugar la activación del ácido carboxílico **2.6** mediante reacción con cloruro de tionilo. Desafortunadamente, no sólo no se consiguió la formación de la molécula deseada sino que, además, se perdía el grupo protector Boc de la amina. En lugar de esto, se intentó activar el ácido con unas condiciones más suaves empleando hexafluorofosfato de azabenzotriazol tetrametil uronio (HATU), una sal de uronio ampliamente utilizada en la síntesis de péptidos. El HATU incorpora simultáneamente un grupo triazol y una carbodiimida, ambos necesarios para la activación del ácido. Aun así, la baja solubilidad del HATU en THF limitó drásticamente el rendimiento de la reacción ($< 5\%$). Finalmente se optó por el empleo de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), ambos solubles en THF. Se consiguió así aumentar el rendimiento de reacción hasta el 50 %. El mecanismo de la reacción se detalla en la **Figura 19**. Aunque el ácido carboxílico alifático es mucho más reactivo que el -COOH aromático presente en el ácido 4-aminosalicílico, que podría competir en la reacción, se tomó la precaución de añadir inicialmente en el matraz de reacción únicamente el ácido 5-(Boc-amino)pentanoico (**2.6**) junto con el HOBT, el DCC y la base. Sólo cuando se observó la formación de un precipitado blanco, –indicativo de la formación del subproducto diciclohexilurea (DCU), y

por tanto, de la activación del ácido carboxílico—, se procedió a la adición del ácido 4-aminosalicílico (**2.5**).

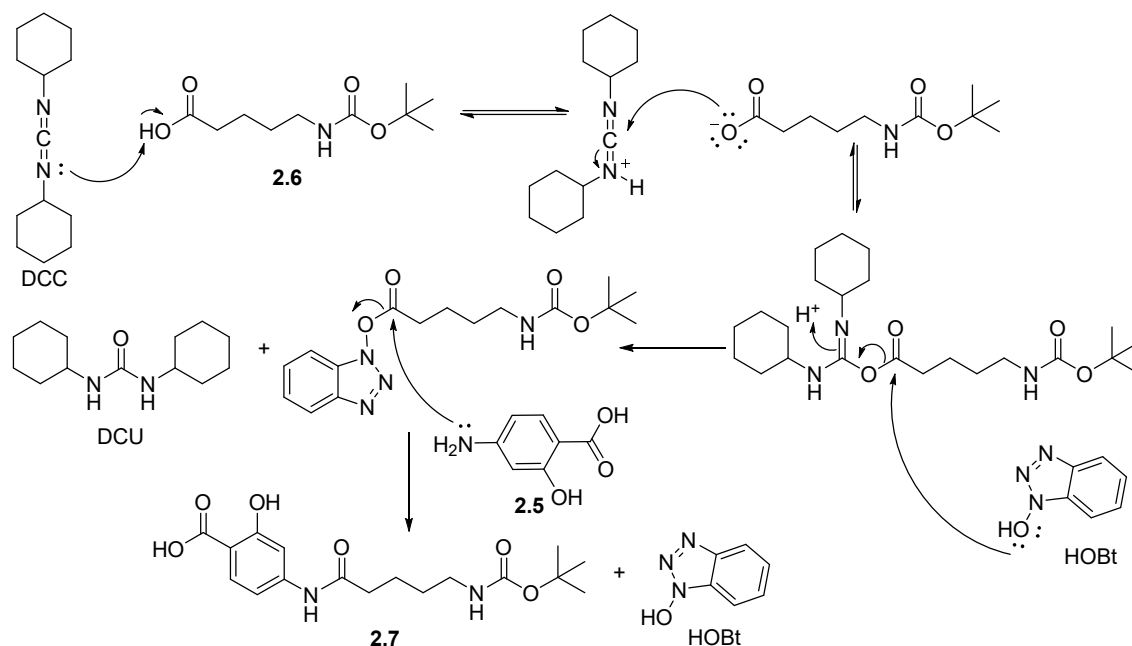


Figura 19. Mecanismo de reacción para la formación de una amida empleando DCC y HOBT como agentes activantes del grupo --COOH .⁵²

La eliminación del grupo protector *terc*-butiloxicarbonilo en la molécula **2.7** (**Figura 19**) se llevó a cabo mediante tratamiento con ácido trifluoroacético, obteniendo finalmente el derivado **AVA-ASA**. La estructura química de **AVA-ASA** se confirmó por ^1H -RMN (**Figura 158**, p. 257), con las señales características de la zona aromática: dos dobletes a 7.76 ppm ($J = 8.68$ Hz) y 7.35 ppm ($J = 2.00$ Hz) y un doblete de dobletes a 7.00 ppm ($J = 8.67$ Hz y 2.06 Hz) indicativos de un acoplamiento en *orto* y otro en *meta*. Entre 3.00 ppm y 1.70 ppm aparece cada una de las señales alifáticas correspondientes a los CH_2 : dos tripletes correspondientes, uno, a los hidrógenos contiguos al grupo --COONH (2.50 ppm $J = 6.76$ Hz) y otro, a los hidrógenos situados en el carbono que contiene el --NH_3^+ (2.96 ppm $J = 6.69$ Hz). Se puede observar además un multiplete (4 H) a 1.74 ppm, correspondiente a los dos CH_2 alifáticos restantes.

Para la derivatización fluorescente del sucedáneo se eligió un colorante tipo boro-dipirrometeno comercial (comúnmente conocidos como BODIPYs), de una intensa fluorescencia y con máximos de absorción y emisión alrededor de 590 y 620 nm, respectivamente. Para facilitar el acoplamiento mediante la formación de un enlace amida, se eligió un BODIPY activado en forma de éster de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (**Figura 20**), evitando así el paso intermedio de activación con carbodiimidas. El mecanismo de reacción se muestra en la **Figura 20**. El rendimiento global

de los 3 pasos de reacción fue del 42 %, y la estructura química de **BODIPY-AVA-ASA** se confirmó mediante técnicas de ^1H -RMN y MS.

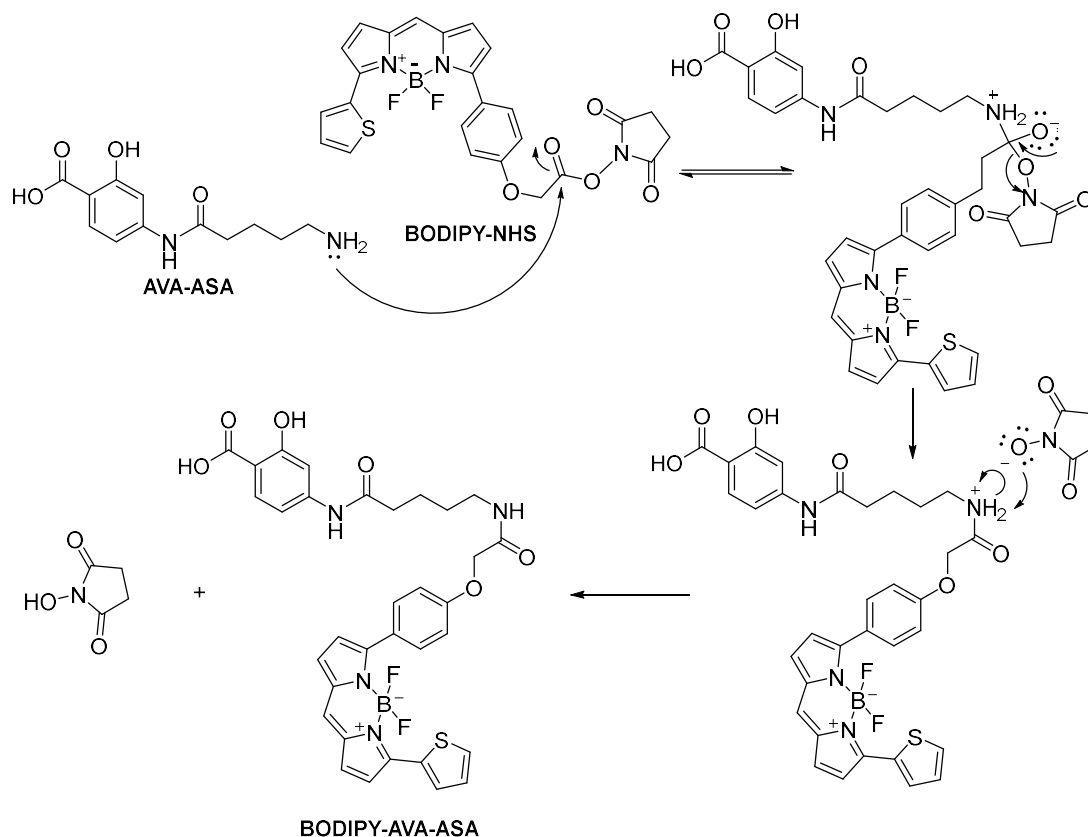


Figura 20. Mecanismo del acoplamiento del BODIPY comercial BODIPY-NHS al sucedáneo AVA-ASA mediante la formación de un enlace amida. Obtención de BODIPY-AVA-ASA.

El espectro de ^1H -RMN es considerablemente complejo debido al gran número de señales aromáticas y la asignación de todas las señales de protón fue imposible. Aun así, se pueden observar señales características, cuyas integrales concuerdan entre sí, de las diferentes partes de las moléculas precursoras **BODIPY-NHS** y **AVA-ASA** (**Figura 21**). Se pudo determinar que las señales correspondientes al ácido 4-aminosalicílico (**2.5**, **Figura 18**) estaban presentes en el espectro final, algo desplazadas pero manteniendo las mismas constantes de acoplamiento que el ácido de partida (señales c, g, e i) en la **Figura 21**). De igual modo se procedió con la identificación de las señales procedentes del BODIPY comercial. Las señales aromáticas más intensas (señales b y h en la **Figura 21**) son las únicas señales aromáticas que deberían integrar por 2 H cada una, por lo que su intensidad destaca sobre las otras; además, sus constantes de acoplamiento de 8.9 Hz correspondiente a un acoplamiento *orto* coinciden entre sí. Por espectrometría de masas se encontró el pico del ion molecular a 656.9 ($\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_6\text{S}^-$), calculado a 656.9. A 251.9 y a 283.9 se observan dos señales que se corresponderían con el **AVA-ASA** y con el **AVA-ASA+MeOH**, que pueden proceder tanto de material de partida sin

reaccionar como de la misma fragmentación de la molécula. Sin embargo, se descartó la presencia de dichas impurezas por la concordancia de las distintas integrales de las señales de ^1H -RMN.

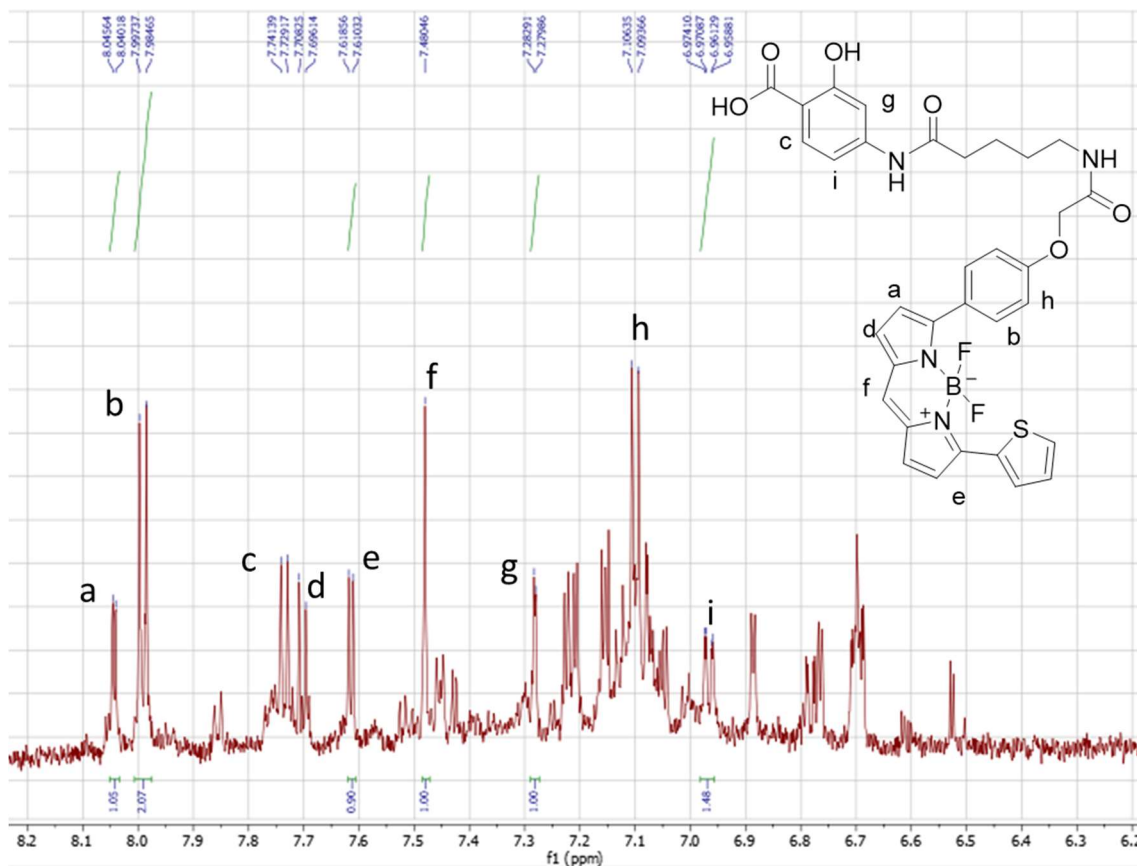


Figura 21. ^1H -RMN (700 MHz, CD_3DO) del BODIPY-AVA-ASA.

Finalmente, se llevó a cabo la caracterización espectroscópica del **BODIPY-AVA-ASA** en disolventes orgánicos y acuosos (determinación de máximos de absorción y emisión, y del rendimiento cuántico de fluorescencia), tal y como se detalla en el siguiente apartado.

3.2.1. Caracterización espectroscópica

Una vez obtenido el **BODIPY-AVA-ASA** se procedió a su caracterización por absorción UV-Vis y fluorescencia en una serie de disolventes. Se llevó a cabo además un estudio comparativo con el colorante BODIPY-NHS de partida, para ver si la derivatización con el sucedáneo de citrinina había afectado a los valores de máximo de absorción, emisión (**Figura 22**) o de rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f). Se comprobó así que el **BODIPY-AVA-ASA** es especialmente soluble en agua y no en disolventes orgánicos como el diclorometano, donde sí lo era el **BODIPY-NHS**.

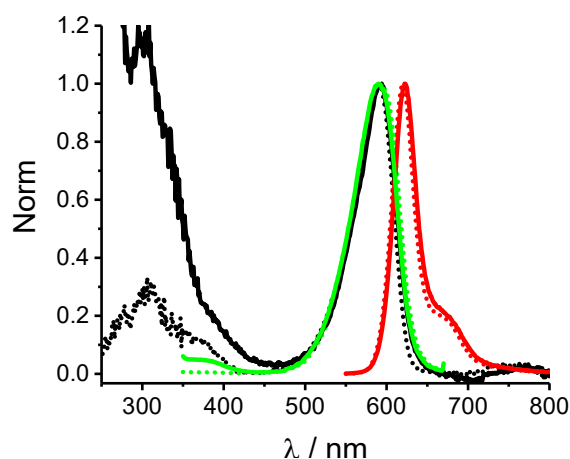


Figura 22. Comparación de los espectros de absorción (negro), emisión (rojo, λ_{exc} 540 nm) y excitación (verde, λ_{em} 680 nm) del sucedáneo de la citrinina fluorescente BODIPY-AVA-ASA (líneas continuas) con los del fluoróforo BODIPY-NHS (líneas de puntos) en etanol.

Para poder comparar los valores de Φ_f entre ambas moléculas y descartar la influencia del disolvente hubo que elegir un medio en el que las dos, **BODIPY-AVA-ASA** y **BODIPY-NHS**, fuesen solubles como el etanol. Se comprobó que el grupo NHS éster no era atacado por el etanol durante la caracterización, llevando a cabo el ^1H -RMN de la molécula antes y después de las medidas, y no se observó cambio alguno. Para la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia se siguió el procedimiento descrito en el apéndice, realizando un triplicado para cada una de las muestras y empleando como patrón una disolución de **BODIPY-NHS** en diclorometano (el propio suministrador, Lumiprobe, proporciona un valor de Φ_f de 0.901 en este disolvente). En el caso de **BODIPY-AVA-ASA** también se determinó el valor de rendimiento cuántico de fluorescencia en agua, por la relevancia de este disolvente para aplicaciones analíticas en muestras reales (por problemas de solubilidad no se pudo determinar el Φ_f para **BODIPY-NHS** en agua). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resumen de los valores de máximos de absorción, emisión y rendimiento cuántico de fluorescencia obtenidos para BODIPY-NHS y BODIPY-AVA-ASA en distintos disolventes ($T = 298 \text{ K}$, en aire).

COMPUESTO	BODIPY-NHS		BODIPY-AVA-ASA	
DISOLVENTE	DCM	EtOH	EtOH	H ₂ O
λ_{ABS} (nm)	593	591	594	591
λ_{EM} (nm)	623	620	623	624
Φ_f	0.901 ± 0.019	0.99 ± 0.03	1.01 ± 0.07	0.193 ± 0.004

Como se puede comprobar tanto en la **Figura 22** como en la **Tabla 3**, los espectros de emisión y excitación del **BODIPY-NHS** y del **BODIPY-AVA-ASA** en etanol coinciden en la región del visible. Las diferencias observadas entre **BODIPY-NHS** y **BODIPY-AVA-ASA** únicamente en el espectro

de absorción a $\lambda < 400$ nm se deben a la estructura aromática del ácido salicílico,⁵³ presente en la molécula sintetizada y no en el BODIPY comercial. Los espectros de emisión de ambas moléculas también son prácticamente superponibles, con un máximo en etanol alrededor de 592 nm.

A la vista de los resultados podemos concluir que ni la emisión de fluorescencia, ni el máximo de absorción del BODIPY comercial se ven afectados (en un mismo disolvente) tras el acoplamiento con **AVA-ASA**, manteniendo valores de rendimiento cuántico de fluorescencia cercanos al 100 % en disolventes orgánicos. Sí se observa (**Figura 23**) que en agua la intensidad de fluorescencia disminuye de forma importante (19 % de rendimiento cuántico), pero es algo que cabe esperar en el caso de colorantes hidrófobos como los BODIPYs, que tienen tendencia a formar agregados no fluorescentes en disolución acuosa. El bajo valor de Φ_f obtenido se considera, no obstante, considerablemente elevado para un fluoróforo orgánico hidrófobo en disolución acuosa.

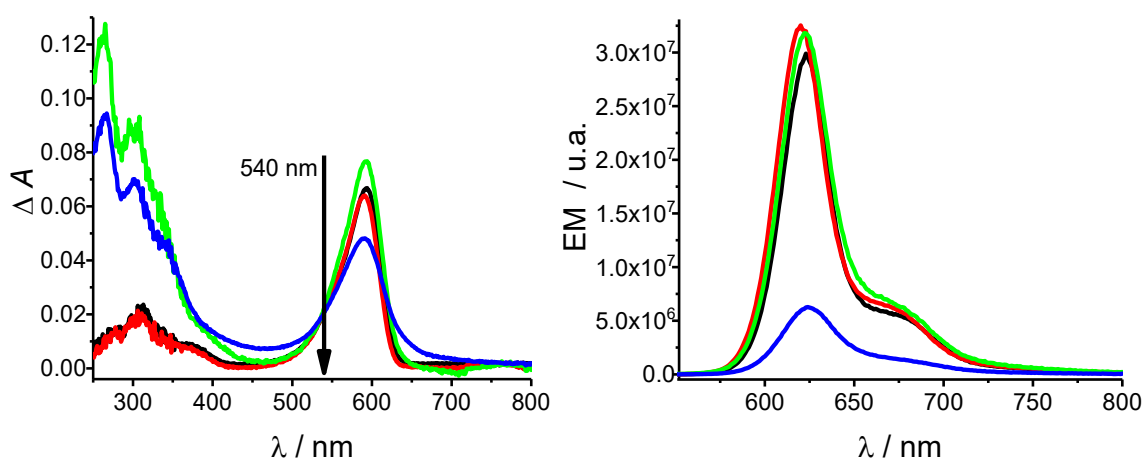


Figura 23. Izquierda: ajuste del valor de la absorción a la longitud de onda de excitación empleada para la determinación de los Φ_f y derecha: espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 540$ nm) para BODIPY-NHS en DCM (negro) y en EtOH (rojo) y para BODIPY-AVA-ASA en EtOH (verde) y en agua (azul).

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Goyal, S.; Ramawat, K.; Mérillon, J.-M., Different shades of fungal metabolites: an overview, *Springer: Germany*, **2017**, 1-29.
2. Peltomaa, R.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C., Bioinspired recognition elements for mycotoxin sensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2018**, *410* (3), 747-771.
3. Pitt, J. I.; Miller, J. D., A concise history of mycotoxin research, *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, *65* (33), 7021-7033.
4. Stockmann-Juvala, H.; Savolainen, K., A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1, *Hum. Exp. Toxicol.*, **2008**, *27* (11), 799-809.
5. Rheeder, J. P.; Marasas, W. F. O.; Vismer, H. F., Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68* (5), 2101-2105.
6. Scott, P. M., Recent research on fumonisins: a review, *Food Addit. Contam. Part A-Chem.*, **2012**, *29* (2), 242-248.
7. Bennett, J. W.; Klich, M., Mycotoxins, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2003**, *16* (3), 497.
8. Marasas, W. F., Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. Environmental health perspectives, *Environ. Health Perspect.*, **2001**, *109* (2), 239-243.
9. Gelderblom, W. C.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W. F.; Thiel, P. G.; Horak, R. M.; Vleggaar, R.; Kriek, N. P., Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, *54* (7), 1806-1811.
10. Bezuidenhout, S. C.; Gelderblom, W. C. A.; Gorst-Allman, C. P.; Horak, R. M.; Marasas, W. F. O.; Spiteller, G.; Vleggaar, R., Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, (11), 743-745.
11. Dutton, M. F., Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects, *Pharmacol. Ther.*, **1996**, *70* (2), 137-161.
12. Frisvad, J. C.; Smedsgaard, J.; Samson, R. A.; Larsen, T. O.; Thrane, U., Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55* (23), 9727-9732.
13. D'Mello, J. P. F.; Placinta, C. M.; Macdonald, A. M. C., *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **1999**, *80* (3), 183-205.
14. Ana-Marija, D., Fumonisin B1: a neurotoxic mycotoxin / Fumonizin B1: neurotoksični mikotoksin, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **2012**, *63* (4), 531-544.
15. Merrill, A. H., Jr.; Wang, E.; Vales, T. R.; Smith, E. R.; Schroeder, J. J.; Menaldino, D. S.; Alexander, C.; Crane, H. M.; Xia, J.; Liotta, D. C.; Meredith, F. I.; Riley, R. T., Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, *392*, 297-306.

16. Plattner, R. D.; Weisleder, D.; Poling, S. M., Analytical determination of fumonisins and other metabolites produced by *Fusarium moniliforme* and related species on corn, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, 392, 57-64.
17. Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Vleggaar, R., Physicochemical data for some selected *Fusarium* toxins, *J. AOAC Int.*, **1996**, 79 (6), 1365-79.
18. Shephard, G. S., Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 815 (1), 31-39.
19. Sydenham, E. W.; Gelderblom, W. C. A.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O., Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn, *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38 (1), 285-290.
20. Holcomb, M.; Thompson, H. C.; Hankins, L. J., Analysis of fumonisin B1 in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection, *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, 41 (5), 764-767.
21. Stockenström, S.; Sydenham, E. W.; Thiel, P. G., Determination of fumonisins in corn: Evaluation of two purification procedures, *Mycotoxin Res.*, **1994**, 10 (1), 9-14.
22. Xu, B.-j.; Jia, X.-q.; Gu, L.-j.; Sung, C.-k., Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin, *Food Control*, **2006**, 17 (4), 271-285.
23. Munawar, H.; Smolinska-Kempisty, K.; Cruz, A. G.; Canfarotta, F.; Piletska, E.; Karim, K.; Piletsky, S. A., Molecularly imprinted polymer nanoparticle-based assay (MINA): application for fumonisin B1 determination, *Analyst*, **2018**, 143 (14), 3481-3488.
24. De Smet, D.; Dubruel, P.; Van Peteghem, C.; Schacht, E.; De Saeger, S., Molecularly imprinted solid-phase extraction of fumonisin B analogues in bell pepper, rice and corn flakes, *Food Addit. Contam. Part A-Chem.*, **2009**, 26 (6), 874-884.
25. Zhang, W.; Xiong, H.; Chen, M.; Zhang, X.; Wang, S., Surface-enhanced molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor based on Ru@SiO₂ for ultrasensitive detection of fumonisin B1, *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 96, 55-61.
26. Smolinska-Kempisty, K.; Guerreiro, A.; Canfarotta, F.; Cáceres, C.; Whitcombe, M. J.; Piletsky, S., A comparison of the performance of molecularly imprinted polymer nanoparticles for small molecule targets and antibodies in the ELISA format, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 37638.
27. Frank, H. K., Citrinin, *Z. Ernährungswissenschaft*, **1992**, 31 (3), 164-177.
28. Abou-Zeid, A. M., Review on citrinin: production, effect of some plant extracts and gene involved in its biosynthesis, *J. Civil Environment. Engg.*, **2012**, 2, 1000113.
29. Warth, B.; Braun, D.; Ezekiel, C. N.; Turner, P. C.; Degen, G. H.; Marko, D., Biomonitoring of mycotoxins in human breast milk: current state and future perspectives, *Chem. Res. Toxicol.*, **2016**, 29 (7), 1087-1097.

30. Hetherington, A. C.; Raistrick, H., Studies in the biochemistry of microorganisms. Part XIV. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, 1931, 220, 269–295.
31. Chang, C.-H.; Yu, F.-Y.; Wang, L.-T.; Lin, Y.-S.; Liu, B.-H., Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2009**, 237 (3), 281-287.
32. de Oliveira Filho, J. W. G.; Islam, M. T.; Ali, E. S.; Uddin, S. J.; Santos, J. V. d. O.; de Alencar, M. V. O. B.; Júnior, A. L. G.; Paz, M. F. C. J.; de Brito, M. d. R. M.; e Sousa, J. M. d. C.; Shaw, S.; de Medeiros, M. d. G. F.; Dantas, S. M. M. d. M.; Rolim, H. M. L.; Ferreira, P. M. P.; Kamal, M. A.; Pieczynska, M. D.; Das, N.; Gupta, V. K.; Mocan, A.; dos Santos Andrade, T. d. J. A.; Singh, B. N.; Mishra, S. K.; Atanasov, A. G.; Melo-Cavalcante, A. A. d. C., A comprehensive review on biological properties of citrinin, *Food Chem. Toxicol.*, **2017**, 110, 130-141.
33. Nakajima, Y.; Iguchi, H.; Kamisuki, S.; Sugawara, F.; Furuichi, T.; Shinoda, Y., Low doses of the mycotoxin citrinin protect cortical neurons against glutamate-induced excitotoxicity, *J. Toxicol. Sci.*, **2016**, 41 (2), 311-319.
34. Abramson, D.; Hulasare, R.; White, N. D. G.; Jayas, D. S.; Marquardt, R. R., Mycotoxin formation in hullless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content, *J. Stored Prod. Res.*, **1999**, 35 (3), 297-305.
35. Flajs, D.; Peraica, M., Toxicological properties of Citrinin, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **2009**, 60 (4), 457.
36. Bovdisova, I.; Zbynovska, K.; Kalafova, A.; Capcarova, M., Toxicological properties of mycotoxin Citrinin, *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, **2016**, 5 (1), 4.
37. Hanika, C.; Carlton, W. W., Toxicology and pathology of citrinin. In *Biodeterioration research*, Llewellyn, G.C.; Dashek, W. V., O'Rear, C. E., Eds. , *Springer: USA*, **1994**, 41–63,
38. European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed, *EFSA J.*, **2012**, 10, 2605-2605.
39. Pohland, A. E.; Schuller, P. L.; Steyn, P. S.; Van Egmond, H. P., Physicochemical data for some selected mycotoxins, *Pure Appl. Chem.*, **1982**, 54, 2219.
40. Lauer, M. H.; Gehlen, M. H.; de Jesus, K.; Berlinck, R. G. S., Fluorescence spectroscopy and confocal microscopy of the mycotoxin citrinin in condensed phase and hydrogel films, *J. Fluoresc.*, **2014**, 24 (3), 745-750.
41. Odhav, B.; Naicker, V., Mycotoxins in South African traditionally brewed beers, *Food Addit. Contam.,* **2002**, 19 (1), 55-61.

42. Gimeno, A., Determination of citrinin in corn and barley on thin layer chromatographic plates impregnated with glycolic acid, *J. AOAC Int.*, **1984**, 67 (1), 194-196.
43. Phillips, R. D.; Hayes, A. W.; Berndt, W. O., High-performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin citrinin and its application to biological fluids, *J. Chromatogr.*, **1980**, 190 (2), 419-27.
44. Kpodo, K.; Sørensen, A. K.; Jakobsen, M., The occurrence of mycotoxins in fermented maize products, *Food Chem.*, **1996**, 56 (2), 147-153.
45. Tuomi, T.; Johnsson, T.; Hintikka, E.-L.; Reijula, K., Detection of aflatoxins (G, B), sterigmatocystin, citrinine and ochratoxin A in samples contaminated by microbes, *Analyst*, **2001**, 126 (9), 1545-1550.
46. Urraca, J. L.; Huertas-Pérez, J. F.; Cazorla, G. A.; Gracia-Mora, J.; García-Campaña, A. M.; Moreno-Bondi, M. C., Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, 408 (11), 3033-3042.
47. Guo, B.-Y.; Wang, S.; Ren, B.; Li, X.; Qin, F.; Li, J., Citrinin selective molecularly imprinted polymers for SPE, *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33 (8), 1156-1160.
48. Fang, G.; Liu, G.; Yang, Y.; Wang, S., Quartz crystal microbalance sensor based on molecularly imprinted polymer membrane and three-dimensional Au nanoparticles@mesoporous carbon CMK-3 functional composite for ultrasensitive and specific determination of citrinin, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2016**, 230, 272-280.
49. Elgazwy, A.-S., Facile synthesis of (R,R) and of (R,S) tricarballic acid anhydride and imide derivatives, *Molecules* **2000**, 5 (4), 665.
50. Peltomaa, R.; Amaro-Torres, F.; Carrasco, S.; Orellana, G.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C., Homogeneous quenching immunoassay for Fumonisin B1 based on gold nanoparticles and an epitope-mimicking yellow fluorescent protein, *ACS Nano*, **2018**, 12 (11), 11333-11342.
51. Carboni, D.; Flavin, K.; Servant, A.; Gouverneur, V.; Resmini, M., The first example of molecularly imprinted nanogels with aldolase type I activity, *Chem.-Eur. J.*, **2008**, 14 (23), 7059-7065.
52. Kostianen, M. A.; Hiekkataipale, P.; de la Torre, J. Á.; Nolte, R. J. M.; Cornelissen, J. J. L. M., Electrostatic self-assembly of virus-polymer complexes, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21 (7), 2112-2117.
53. Suresh, S.; Gunasekaran, S.; Srinivasan, S., Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, NMR and UV-Visible) and quantum chemical studies of molecular geometry, Frontier molecular orbital,

NLO, NBO and thermodynamic properties of salicylic acid, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **2014**, 132, 130-141.

Capítulo 3: Síntesis y caracterización de *building blocks* o elementos precursores de polímeros conjugados luminiscentes (CLPs)

1. OBJETIVOS.....	95
2. RECONOCIMIENTO MOLECULAR.....	97
2.1. Sensores químicos.....	98
2.2. Importancia del reconocimiento y detección de iones: ion carboxilato.....	99
3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN TRANSITORIA EN EL FEMTOSEGUNDO.....	100
4. RESULTADOS	106
4.1. Síntesis.....	106
4.1.1. Síntesis de elementos precursores para la detección de ácidos carboxílicos...	106
4.1.2. Síntesis de elementos precursores para la detección del anión carboxilato....	109
4.2. Caracterización por espectroscopia de absorción y fluorescencia	121
4.3. Caracterización por fluorescencia resuelta en el tiempo.....	137
4.3.1. Caracterización espectroscópica resuelta en el tiempo	138
4.3.2. Cálculos computacionales	141
4.3.3. Valoración de la respuesta óptica resuelta en el tiempo de los diferentes elementos precursores a la presencia del ion acetato	144
5. BIBLIOGRAFÍA.....	147

1. OBJETIVOS

Anteriormente a la obtención de los polímeros conjugados luminiscentes (CLPs) se abordará la síntesis de una serie de moléculas a las cuales se les ha dado el nombre de elementos precursores, traducción propia del inglés *building blocks*. Este término es empleado en el campo de la química supramolecular para hacer referencia a un fragmento molecular perteneciente a una unidad de mayor tamaño, que posee los grupos funcionales reactivos.¹ Esta aproximación, por ejemplo, se utiliza mucho en el descubrimiento de fármacos, para estudiar la interacción de los grupos funcionales con las dianas biológicas.²

Con el objetivo final de desarrollar CLPs para la amplificación de la señal luminiscente en el proceso de reconocimiento y detección de analitos de interés, se sintetizarán nuevos receptores fluorescentes derivados del 1,4-diestirilbenceno (**DSB**, **Figura 24**). La estructura del **DSB** imita los elementos de construcción de las cadenas poliméricas conjugadas de interés. Sobre ésta se realizaron diferentes modificaciones:

- Sustitución del anillo aromático central por otros que posean grupos “de reconocimiento” (piridinas, aminas, ureas y tioureas), capaces de interactuar con los diferentes analitos de interés.
- Adición de sustituyentes en los anillos aromáticos terminales con diferentes características electrónicas, para estudiar su influencia en la interacción con los analitos y en la respuesta fotoquímica.

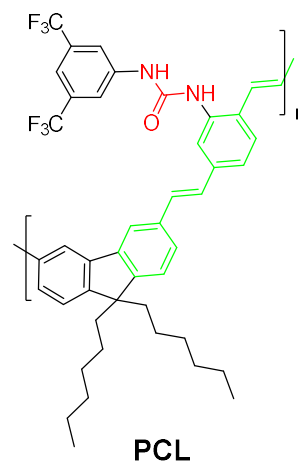
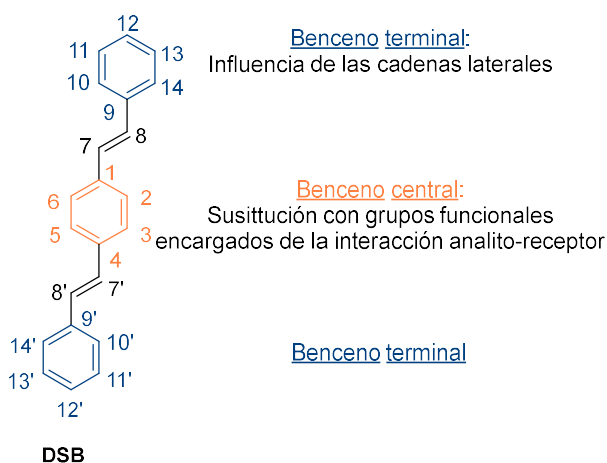


Figura 24. (Izquierda) Estructura molecular del 1,4-diestirilbenceno (DSB), bloque precursor de los CLPs descritos en esta Tesis. (Derecha) Ejemplo de CLP que contiene la unidad repetitiva DSB-urea.

Finalizada la síntesis, se procederá a la caracterización espectroscópica de las moléculas y de su respuesta óptica en presencia de diferentes analitos modelo: i) el ácido trifluoroacético (TFA), para el estudio de la respuesta ácido-base con receptores basados en compuestos nitrogenados

o ii) el anión acetato, de especial interés en la presente Tesis debido a la presencia de grupos carboxilato en diferentes micotoxinas.

Una segunda parte de este capítulo se centrará en la caracterización espectroscópica, mediante técnicas de espectroscopía cinética láser con resolución temporal en la escala de los femtosegundo, de los elementos precursores urea. Pese a que los receptores basados en ureas son de los más empleados en el reconocimiento molecular de carboxilatos³ poco se sabe acerca de la secuencia de eventos que ocurren justo después de la formación del estado excitado electrónico en los aductos de urea-carboxilato fluorescentes. Dicha caracterización fue posible gracias a la realización de una estancia predoctoral en el grupo LASIR de la Universidad de Lille (Francia) (Prof. Poizat/Dr. De Waele). Un conocimiento más detallado de la fotoquímica del estado excitado ayudará a diseñar mejores sensores-receptores, con el objetivo de incorporarlos en materiales de reconocimiento adecuados para desarrollar sensores ópticos para carboxilatos.

2. RECONOCIMIENTO MOLECULAR

En 1987 los químicos J. M. Lehn, D. J. Cram, y C. J. Pedersen recibieron el Premio Nobel de Química por el desarrollo y aplicación de moléculas capaces de intervenir en interacciones estructurales específicas de alta selectividad, conocidas como **reconocimiento molecular**.⁴ Fue el Prof. Lehn⁵ quien definió, por primera vez, el término "*Química Supramolecular*" como la parte de la Química encargada del estudio de los enlaces intermoleculares. La Química Supramolecular está presente en numerosos campos científicos como son la Biología, la Ciencia de los Materiales o la Química. En esta última, concretamente en el área de la Química Analítica,⁶ está teniendo un gran impacto en el desarrollo de nuevos sensores gracias al dominio del reconocimiento molecular mediante interacciones intermoleculares selectivas o específicas. El Prof. Vögtle,⁷ otro de los pioneros en el área, definió esta parte de la Química como "*la Química más allá de la molécula, una Química de interacciones intermoleculares de diseño*", esto es, interacciones creadas específicamente para que se produzca el reconocimiento molecular de interés.

El reconocimiento molecular se basa en tres *conceptos básicos*: i) el concepto de **receptor**, introducido por el Prof. Ehrlich;⁸ ii) la **selectividad** de la unión, basada en el principio cerradura-llave postulado más tarde por el Prof. Fischer⁹ y, finalmente, iii) la teoría de la Química de la **coordinación** del Prof. Werner,¹⁰ que explica la afinidad mutua entre sustrato y receptor.

Las interacciones no covalentes son el elemento principal de la Química Supramolecular¹¹ y son esenciales en los sistemas biológicos, desempeñando funciones vitales como la transducción de señal, el transporte selectivo de iones y pequeñas moléculas a través de las membranas, las reacciones enzimáticas o la formación de agregados supramoleculares.¹²⁻¹⁴ Entre las interacciones supramoleculares encontramos una gran diversidad, incluyendo interacciones electrostáticas,¹⁵⁻¹⁶ enlaces de hidrógeno,¹⁷⁻¹⁸ apilamientos π - π ,¹⁹⁻²⁰ fuerzas de van der Waals,²¹ coordinación de metales,²² interacciones hidrofóbicas y el efecto del disolvente.²³⁻²⁴

Inspirados en la naturaleza, los químicos han desarrollado sistemas altamente complejos a partir de componentes que interactúan a través de fuerzas intermoleculares no covalentes.²⁵ Los receptores artificiales reconocen las moléculas de forma *selectiva*, lo que es de aplicación en diferentes campos²⁶ como los procesos de catálisis,²⁷ el transporte selectivo de fármacos,²⁸ el desarrollo de máquinas moleculares,²⁹ la nanotecnología³⁰ o el desarrollo de nuevos sensores químicos, tema en el que se centra este trabajo.^{11, 31}

2.1. Sensores químicos

El reconocimiento molecular en sí no basta para la detección de un analito; precisa de la introducción de un mecanismo de **transducción** de señal.³² La parte receptora ha de complementarse de algún modo con una subunidad transductora capaz de transformar la información química, que se produce al interaccionar el analito con el receptor, en una forma de energía que pueda transformarse en una señal analítica medible. Según la IUPAC, esas son las dos unidades básicas que debe de poseer un sensor,³³ aunque no son las únicas, como se muestra en la **Figura 25**. Éste también puede poseer una barrera física que impida el paso de ciertos interferentes, al receptor. En la presente Tesis se ha buscado que los CLPs actúen a la vez como receptor y transductor. Finalmente, un sensor también precisa de otros elementos que llevan a cabo funciones como el muestreo, el transporte de muestra y el procesado de la señal y los datos.

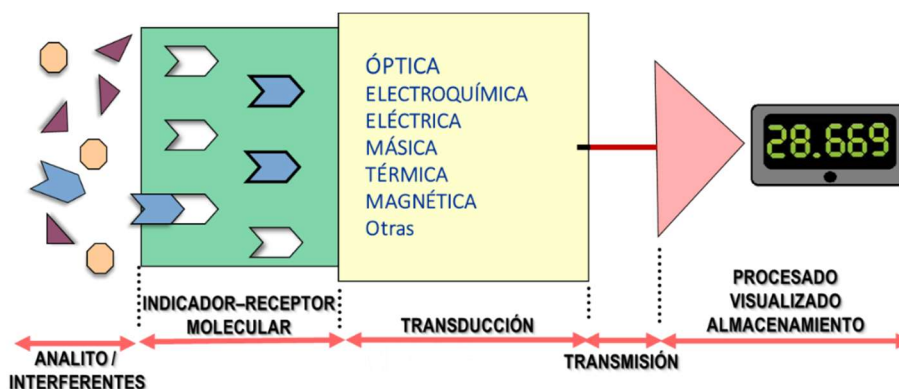


Figura 25. Componentes de un sensor químico. El elemento de reconocimiento interactúa selectivamente con el analito de interés dando lugar a la señal analítica.

Así, un sensor químico se puede definir como “*un dispositivo miniaturizado compuesto de un elemento de reconocimiento, un elemento transductor y un procesador de señal, que responde a un analito particular, de modo selectivo, y es capaz de medir una concentración química de forma continua y reversible*”.³³⁻³⁵

Los sensores químicos se pueden clasificar de diferentes formas. Como observamos en la **Figura 25**, una de ellas puede ser por el mecanismo de **transducción** que éste emplea (óptico, magnético, eléctrico, térmico, másico,...).³⁶ En esta Tesis, el cambio en la intensidad de la señal de fluorescencia es el modo de transducción elegido. Otra posible clasificación se basa en la naturaleza del elemento de **reconocimiento**: i) con receptor biológico o biosensores, en los que el encargado del reconocimiento molecular es una biomolécula (enzima, anticuerpo, ácido nucleico, incluso células completas...); ii) con receptor químico, que son los más utilizados y suelen emplear moléculas de bajo peso molecular, pudiendo estar inmovilizadas o no

(membranas, electrodos selectivos, metales...) y iii) con receptor biomimético, tratando de imitar los sistemas biológicos para conseguir un reconocimiento selectivo y, normalmente, de origen sintético, por lo que suelen presentar una mayor estabilidad que los receptores biológicos a los que tratan de reemplazar. Entre ellos, se pueden citar, por ejemplo, las proteínas modificadas, los aptámeros o los *polímeros con impronta molecular* (MIPs)³⁷ siendo estos últimos los elegidos en es la presente Tesis.

2.2. Importancia del reconocimiento y detección de iones: ion carboxilato

Los iones desempeñan un papel fundamental en una gran variedad procesos, tanto a nivel biológico, interviniendo en procesos que van desde la regulación de la presión arterial hasta la ayuda al transporte del oxígeno en la sangre,³⁸⁻³⁹ como medioambiental o en aplicaciones industriales (intercambiadores iónicos para la depuración de aguas).⁴⁰ Por ello, el desarrollo de nuevos materiales específicos para la detección de iones, es un tema de gran interés en los campos de la Química Analítica y Supramolecular.⁴¹⁻⁴²

Entre el gran número de analitos iónicos, los aniones **carboxilato** son particularmente interesantes debido a su presencia en infinidad de moléculas importantes como los aminoácidos,³² los ácidos grasos,⁴³ las enzimas⁴⁴ o las toxinas,⁴⁵ estas últimas de especial relevancia en esta Tesis. Las especies carboxiladas también son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica en la producción de aminoácidos no naturales.⁴⁶

El reconocimiento molecular de carboxilatos está basado en interacciones electrostáticas y/o en la formación de **enlaces de hidrógeno**, debido a que estos aniones pueden actuar como **aceptores de hidrógeno**.⁴⁷ El diseño de la gran mayoría de receptores aniónicos contiene fragmentos NH (**Figura 26**), que pueden actuar como dadores de hidrógeno en la formación del complejo de unión analito-receptor.⁴⁷⁻⁴⁸ Algunos de los receptores más empleados en el reconocimiento de aniones son derivados de pirrol,⁴⁹ amidas,⁵⁰ ureas y tioureas,⁵⁰ sales de guanidinio,⁵¹ sulfonamidas⁵² o biimidazoles,⁵³ cuyas estructuras se representan en la **Figura 26**. En la presente Tesis se han elegido las **ureas** como grupo receptor.

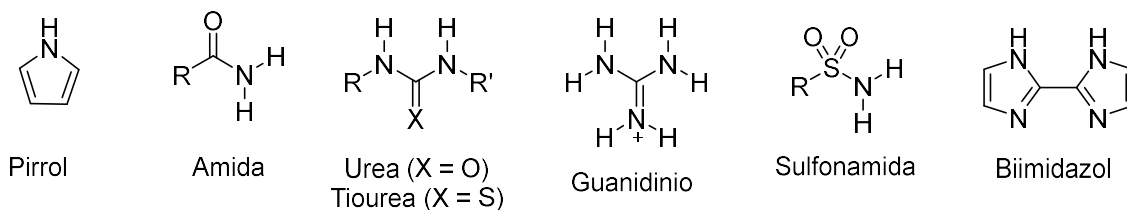


Figura 26. Principales estructuras empleadas para la elaboración de receptores de aniones acetato basados en la interacción por enlace de hidrógeno.

Los receptores moleculares basados en ureas son los más empleados en el reconocimiento molecular de carboxilatos,⁵⁴ desde que en 1992 el grupo del Prof. Wilcox sintetizase un derivado de urea capaz de formar un complejo estable con el ion carboxilato.⁵⁵ Esto es debido a la geometría favorable del receptor para proporcionar una doble interacción por enlace de hidrógeno, con una disposición paralela, dando lugar a la formación de un “anillo” plano estable de 8 miembros.^{3,54} Esta interacción direccional confiere a las ureas la capacidad de distinguir oxoaniones, como acetato, fosfato o sulfato, de otro tipo de aniones de geometría inespecífica.^{54, 56-58} Además, la capacidad dadora del hidrógeno de la urea se puede modular introduciendo grupos deficientes en electrones,^{47, 54, 56} lo que permite incrementar la afinidad de la urea por los aniones.⁵⁹

Actualmente, el grupo de investigación donde se ha llevado a cabo el presente trabajo, se encuentra trabajando en el desarrollo de nuevos métodos para la detección y determinación de diferentes **micotoxinas**. De especial interés son la citrinina (CT), la ocratoxina A (OTA) y la fumonisina B₁ (FB₁), que se caracterizan por la presencia de ácidos carboxílicos en sus estructuras (**Figura 1** del capítulo 1 p. 32), de ahí el interés por el reconocimiento de aniones carboxilato.

3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN TRANSITORIA EN EL FEMTOSEGUNDO

La finalidad de este apartado es realizar una pequeña introducción a la técnica de espectroscopía cinética láser ultrarrápida de absorción transitoria (ΔA) resuelta en el tiempo, para dotar al lector de los conceptos básicos necesarios para entender los resultados obtenidos en la presente Tesis, sin llegar a profundizar en aspectos como las diferentes técnicas empleadas para la formación de pulsos ultracortos⁶⁰⁻⁶¹ y su caracterización⁶²⁻⁶³ o los diferentes métodos empleados para el tratamiento de datos.⁶⁴ En bibliografía podemos encontrar diferentes aplicaciones de esta poderosa técnica, como por ejemplo, para el estudio de sistemas fotosintéticos⁶⁵⁻⁶⁷ o de materiales fotoconductores.⁶⁸⁻⁶⁹

La espectroscopía resuelta en el tiempo permite el estudio de los procesos dinámicos que tienen lugar tras la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, y que transcurren generalmente en tiempos muy cortos.⁷⁰ Existen diferentes técnicas, además de la absorción UV-Vis resuelta en el tiempo. Podemos encontrar también la espectroscopía de absorción en el infrarrojo resuelta en el tiempo⁷¹ o la de fluorescencia.⁷²

La espectroscopía de absorción resuelta en el tiempo se basa en la aplicación de dos pulsos de luz láser ultrarrápidos, conocidos en inglés como *pump-probe* (que se podría traducir como bombeo/monitorización). El primero, o *pump pulse*, es un pulso monocromático y muy

energético que se encarga de **modificar el estado fundamental** de la molécula; seguidamente llega el segundo pulso, o *probe pulse*, energéticamente mucho más débil, encargado de **monitorizar la respuesta** de la muestra al primer pulso (**Figura 27**).^{64, 67} Gracias a esta técnica y a la aparición de los láseres pulsados de femtosegundo, se pueden estudiar procesos ultrarrápidos como la solvatación de las moléculas en el estado excitado, algunas reacciones químicas, cambios conformacionales en las moléculas, el cruce intersistemas o la transferencia electrónica o de protón en el estado excitado.⁷⁰

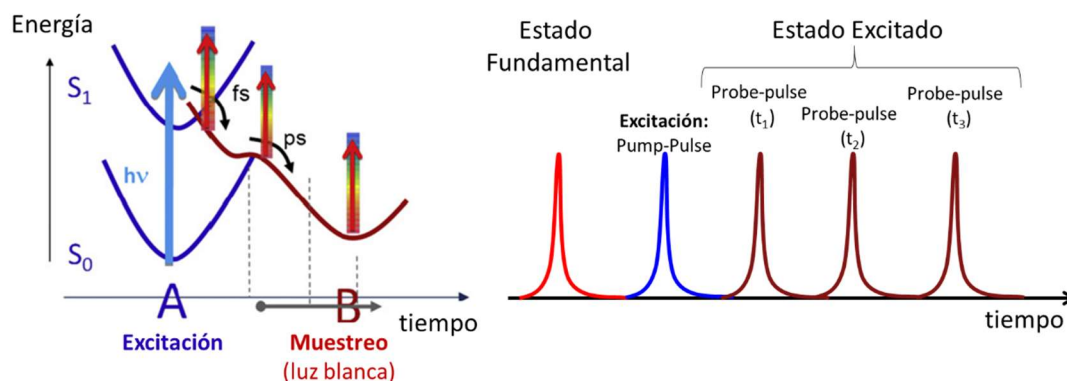


Figura 27. Principio de la técnica espectroscópica resuelta en el tiempo “absorción transitoria”. Tras el pulso de excitación se produce la absorción del pulso *probe* por parte de la molécula excitada a estados energéticos superiores.

La obtención de un espectro de absorción transitoria se produce del siguiente modo: en primer lugar, una pequeña fracción de la muestra es promocionada a un estado electrónico de mayor energía por la acción del *pump pulse* (bombeo láser). Una vez la muestra ha sido excitada, pasa a través de ella un segundo haz de luz láser, el *probe pulse*, con un cierto tiempo de retraso fijado al principio del experimento y que se mantiene constante. El *pump pulse* pasa a través de un bloqueante óptico antes de llegar a la muestra. Este obturador está sincronizado con el amplificador, de tal modo que cualquier otro pulso que pueda producir la excitación de la muestra quede bloqueado. De esta forma, la muestra está siendo excitada y no excitada alternativamente, mientras que el *probe pulse* pasa a través de ella y llega al detector, recibiendo dos tipos de señales diferentes: i) una primera perteneciente a la muestra mientras está siendo excitada (I_{pump}) y ii) otra que se corresponde con la muestra sin el pulso de excitación ($I_{\text{un-pumped}}$). Cada una de estas medidas es almacenada por el programa de forma separada, y se repiten hasta alcanzar una relación señal-ruido aceptable. Al guardar cada uno de los disparos por separado, el propio programa descarta aquellos que difieren significativamente de los otros. Otro método para mejorar esta relación, es la adición de un segundo haz de luz blanca que nunca se superpone con el pulso de excitación y actúa como haz de referencia.⁶⁷ Finalmente el

programa muestra el espectro de ΔA a partir de los valores promediados de I_{pump} y $I_{\text{un-pump}}$ y corregidos por el haz de referencia, según la **ecuación 3.1**:^{70, 73}

$$\Delta A(\lambda, t) = -\log \left(\frac{I(t, \lambda)_{\text{probe}}^{\text{pumped}}}{I(t, \lambda)_{\text{probe}}^{\text{un-pumped}}} \times \frac{I(t, \lambda)_{\text{ref}}^{\text{un-pumped}}}{I(t, \lambda)_{\text{ref}}^{\text{pumped}}} \right) \quad (3.1)$$

donde $I(t, \lambda)_{\text{probe}}^{\text{pumped}}$ hace referencia a la intensidad del *probe-pulse* que llega al detector cuando la muestra está siendo irradiada por el *pulse-probe*, $I(t, \lambda)_{\text{probe}}^{\text{un-pumped}}$ es la intensidad que recibe el detector perteneciente al *probe-pulse* cuando ha cesado el *pulse-probe*. Del mismo modo $I(t, \lambda)_{\text{ref}}^{\text{un-pumped}}$ y $I(t, \lambda)_{\text{ref}}^{\text{pumped}}$ hacen referencia a la intensidad que llega al detector durante y tras la excitación de la muestra a través del *probe pulse* pero de una parte de la muestra que en ningún momento ha interactuado con el pulso de excitación, utilizando estas medidas para la corrección de los espectros. Seguidamente se repite todo el proceso modificando el tiempo de retraso entre el *pump pulse* y el *probe pulse* (**Figura 28**).⁷⁴

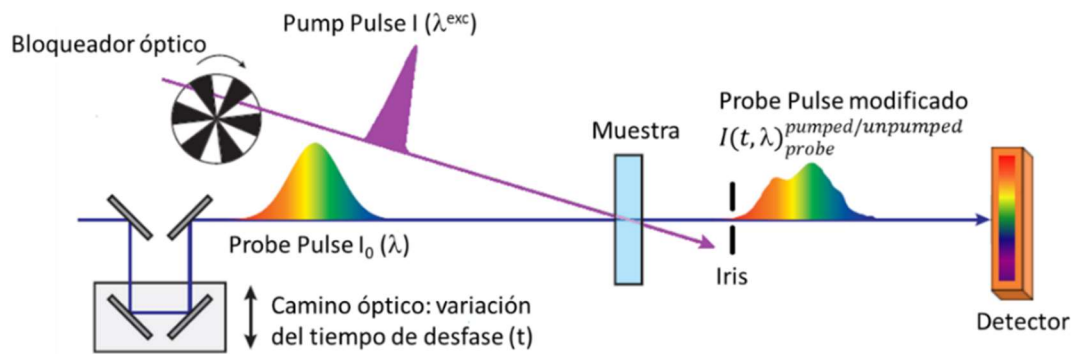


Figura 28. Representación esquemática de un experimento *pump-probe* para medir los procesos dinámicos moleculares fotoinducidos. En la técnica de absorción transitoria, un pulso láser excita la muestra, mientras que un pulso de muestreo retrasado temporalmente mide el cambio inducido por la excitación láser en las muestras con y sin dicha excitación.

Dependiendo de la naturaleza de la fuente de excitación empleada para el muestreo, la obtención de los espectros de ΔA será diferente. Si el haz de luz es monocromático, se obtendrá una curva de extinción y, variando la longitud de onda de esta, se podrá reconstruir el espectro en el rango deseado mientras que, para obtener directamente el espectro completo, se debe emplear un pulso de amplio espectro. La detección de ambos también será diferente: mientras que el pulso monocromático se puede detectar mediante un fotodiodo, el pulso de amplio espectro es dispersado y registrado mediante una CCD o una hilera de fotodiodos, como se observa en la **Figura 29**.^{64, 67, 69}

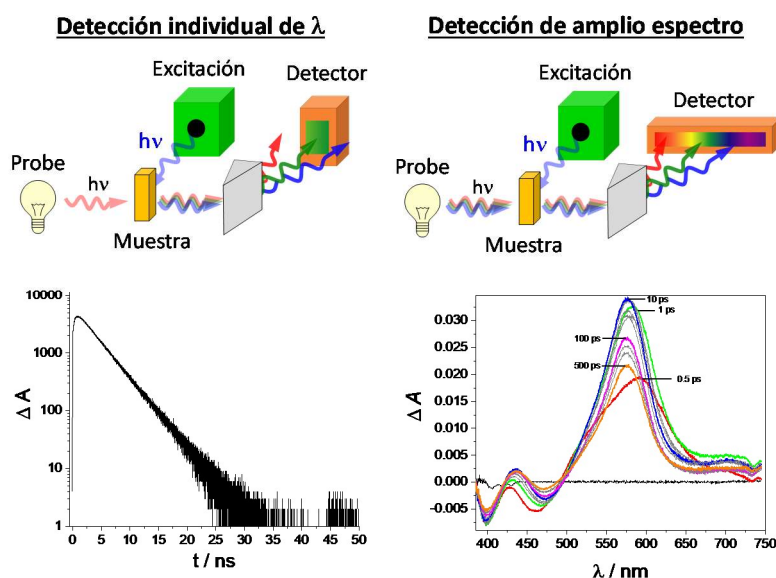


Figura 29. Comparación de los espectros de absorción transitoria obtenidos, dependiendo de la naturaleza del pulso empleado para el muestreo.

La interpretación de los espectros de absorción transitoria no es algo trivial. En la parte inferior derecha de la **Figura 29**, se pueden observar tanto valores positivos como negativos de la señal. Esto es debido a que este tipo de espectros son el resultado de la resta de dos espectros y la contribución de diferentes procesos (**Figura 30**).^{64, 67}

- Decoloración del estado fundamental (DEF): parte de las moléculas de la muestra se encuentran en el estado excitado, con lo que el número de moléculas en el estado fundamental ha disminuido. La absorción de la muestra no excitada disminuye, de manera que el $I_{\text{un-pump}}$ que llega al detector es mayor. Este término se encuentra restando, con lo que se produce una señal negativa en el espectro de ΔA en la región de la absorción del estado fundamental.
- Emisión estimulada (EE): mientras la muestra está excitada, se puede producir el proceso de emisión estimulada. En éste, un fotón del haz incidente induce la emisión de otro fotón de la molécula excitada, el cual es emitido en la misma dirección que el pulso incidente, siendo ambos detectados a la vez. Esto produce un aumento de la $I_{\text{un-pumped}}$, provocando de nuevo una señal negativa en el espectro de ΔA pero, esta vez, en la región de la fluorescencia del compuesto.
- Absorción del estado excitado (AEE): con el *probe pulse* se produce la absorción de las moléculas en el estado excitado. Esto se traduce en una disminución de la intensidad de luz que llega al detector, generando una señal positiva en el espectro de ΔA .

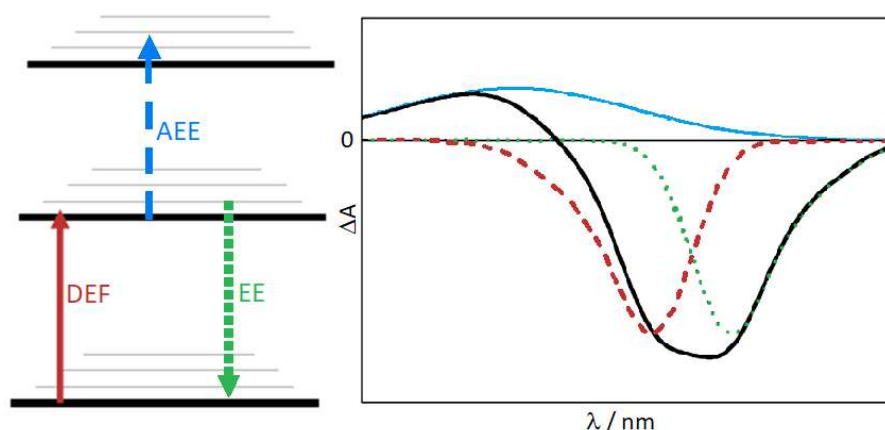


Figura 30. Diagrama de energía molecular y las correspondientes señales de los diferentes procesos que pueden constituir un espectro de absorción transitoria. En negro, la suma total de todos los procesos que forman el espectro de absorción transitoria; en rojo, decoloración del estado fundamental (DEF); en verde, emisión estimulada (EE) y, en azul, absorción del estado excitado (AEE).

La cantidad de datos generada en cada uno de los experimentos de absorción transitoria es inmensa. Para poder extraer información útil de estos, se suele abordar el tratamiento de datos por partes.⁶⁴

- i. Representación de la intensidad de la señal para diferentes longitudes de onda para un mismo tiempo.
- ii. Representación de la intensidad de la señal para diferentes longitudes de onda, para diferentes intervalos de tiempo.
- iii. Representación de la intensidad de la señal a una longitud de onda en concreto para diferentes tiempos.

Esta forma de proceder solo suele ser efectiva para modelos cinéticos simples donde cada especie transitoria posee un espectro muy distinto, lo que permite seleccionar longitudes de onda específicas para estudiar cada caso. Normalmente se hace necesario el uso de otras técnicas resueltas en el tiempo, así como la aplicación de métodos de análisis de datos cinéticos más avanzados.

A modo de ejemplo, se muestra a continuación una configuración típica para la obtención de espectros de absorción transitoria ultrarrápida con láseres de femtosegundo. Dicha configuración fue la empleada durante la estancia en los laboratorios del grupo de investigación LASIR de la Universidad de Lille (**Figura 31**).⁶⁴

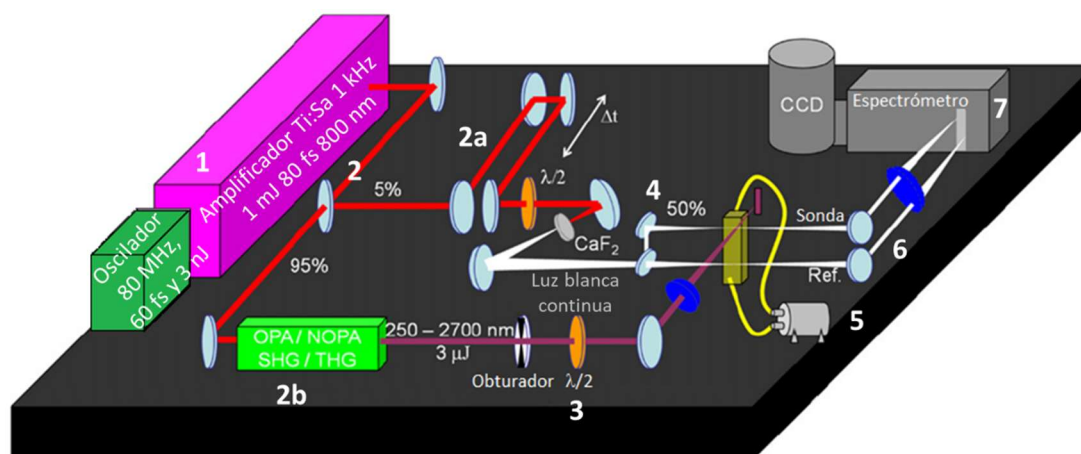


Figura 31. Representación esquemática de la configuración empleada para la realización de las medidas de absorción transitoria con láseres de femtosegundo. Imagen adaptada de la ref. ⁶⁴ Señalizados con números se encuentran las partes más relevantes del experimento, las cuales se explican en el texto.

Algunas partes relevantes del experimento son:

1. En primer lugar, la generación del pulso de excitación no es algo trivial; para la formación de éste se parte de un oscilador que genera un pulso de 80 MHz, 60 fs y 3 nJ. Este pulso se elonga en una segunda cavidad, pasando de un pulso de femtosegundo a otro en la escala de los picosegundos, perdiendo algo de energía. Este pulso pasa al amplificador y finalmente al compresor desde donde es enviado para llevar a cabo el experimento.
2. El pulso de excitación es dividido en dos haces:
 - a. el menos energético (5 %) es utilizado para generar luz blanca continua haciéndolo pasar a través de un cristal de CaF_2 . Este haz se utiliza para el muestreo. Además, el pulso recorre un camino de retardo óptico modulable para proporcionar los diferentes tiempos de *retraso* (Δt).
 - b. El más energético (95 %) se utiliza para generar el pulso de excitación. Para seleccionar la λ_{exc} se hace uso de un amplificador óptico paramétrico (OPA). Este está constituido por una serie de cristales ópticos, lineales o no-lineales, que, gracias a la generación de armónicos, permiten la modulación de la longitud de onda resultante.
3. Para controlar la polarización de los haces *pump-probe* se utilizan filtros ópticos de media onda y se establece el ángulo mágico (54.7°) entre ambos.
4. El pulso de muestreo se divide en dos para crear el haz de luz blanca que se utiliza como referencia.
5. Para evitar la posible degradación de la muestra, ésta se encuentra en una celda de flujo continuo.

6. El estado fundamental de la muestra es perturbado por el pulso de excitación; tras él, el pulso de muestreo (luz blanca) atraviesa la muestra perpendicularmente por la misma zona. Este tiempo va variando gracias al retraso óptico. Además, el haz de referencia también atraviesa la muestra, pero por una zona no excitada.
7. El pulso de muestreo y el haz de referencia son detectados.

4. RESULTADOS

4.1. Síntesis

4.1.1. Síntesis de elementos precursores para la detección de ácidos carboxílicos

Para la síntesis de los elementos precursores sensibles a grupos ácidos se emplearon dos tipos diferentes de moléculas fluorescentes: una diestirilpiridina (**BSP**) y un dialquilamino-diestirilbenceno (**BSNet2**) cuya síntesis se recoge en la **Figura 32** y en la **Figura 33**, respectivamente.

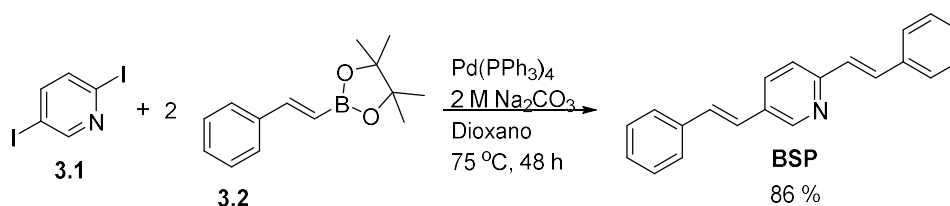


Figura 32. Procedimiento seguido para la obtención del bloque precursor BSP para la detección de ácidos carboxílicos.

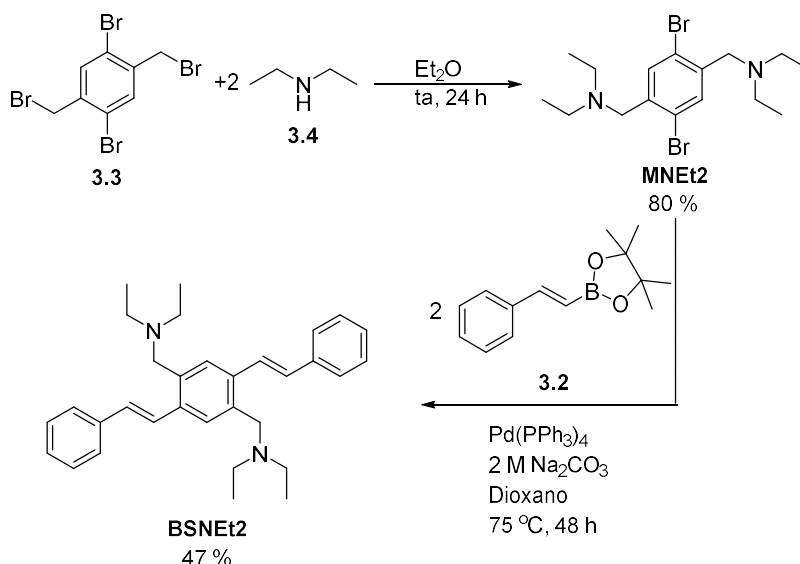


Figura 33. Procedimiento seguido para la obtención del bloque precursor BSNet2 para la detección de ácidos carboxílicos.

Partiendo de la 2,4-diiodopiridina (**3.1**) y del éster del ácido pinacol *trans*-2-fenilvinilborónico (**3.2**), ambos disponibles comercialmente, se llevó a cabo un acoplamiento C-C tipo Suzuki-Miyaura catalizado por paladio. Tras su purificación por columna se obtuvo un polvo amarillo correspondiente al bloque precursor **BSP**. Pese a que el espectro de ^1H -RMN (**Figura 162** en el anexo, p. 259) resultó ser bastante complejo, las señales del anillo aromático de la piridina (un doblete a 8.72 ppm ($J = 1.90$ Hz), un doblete de dobletes a 7.89 ppm $J = 8.27$ Hz y $J = 2.06$ Hz y un doblete a 7.46 ppm ($J = 8.46$ Hz), así como las de los dobles enlaces en configuración *trans* (7.66 ppm, $J = 16.06$ Hz y 7.09 ppm, $J = 16.31$ Hz), confirmaron la estructura de la molécula obtenida.

Como se observa en la **Figura 32**, el receptor molecular (la entidad piridínica) se encuentra incorporada en la cadena principal, hecho que ocurriría también en el CLP correspondiente. En la **Figura 73** del capítulo 4 (p. 158) se muestran diferentes CLPs descritos en bibliografía para la detección de distintos analitos. Normalmente, el receptor molecular no se encuentra conjugado con la cadena principal. En la presente Tesis, se ha optado por que la parte encargada de la interacción con el analito sí se encontrase conjugada, a excepción del compuesto **BSNet2**, pensando que con ello aumentaría la sensibilidad de los elementos precursores y de los CLPs. Para la **BSP** se espera observar una protonación de la unidad piridínica (el pK_a de la piridina es 5.5), más básica que los grupos ácido carboxílico que poseen los analitos de interés.

Por otra parte, se sintetizó la *N,N'*-((2,5-dibromo-1,4-fenilen)bis(metilen))bis(*N*-etiletanamina) (**BSNet2**, **Figura 33**). Se trata de una amina terciaria que no está conjugada con la cadena principal, sino que existe un carbono sp^3 que rompe esta conjugación actuando como espaciador. En este caso, en el ligando libre se podría dar un proceso de desactivación de fluorescencia por una transferencia electrónica fotoinducida (PET) desde el par de electrones no enlazados del nitrógeno al fluoróforo. La intención es que la protonación del nitrógeno con el analito de interés origine un aumento de la señal luminiscente debido a la inhibición del proceso PET. En la **Figura 34**, se presenta el mecanismo general para la detección de un analito con carga positiva, basado en la inhibición del proceso PET.⁷⁵⁻⁷⁷

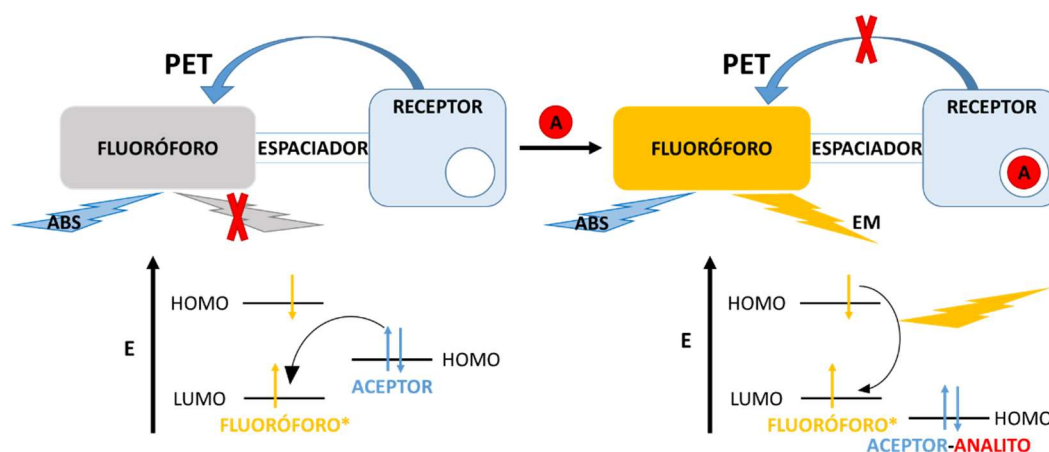


Figura 34. Mecanismo y diagrama de energía para la detección de un analito con carga positiva basada en respuesta PET tipo "off-on".

La obtención del **MNet2** se llevó a cabo a través de una reacción S_N2 de la amina sobre el bromo bencílico. El rendimiento de un 80 % obtenido, se debe a la formación del subproducto de monosustitución, lo que se podría evitar aumentando los equivalentes de la amina, la temperatura y/o tiempos de reacción. El espectro de 1H -RMN (**Figura 163** en el anexo, p. 260) confirma la estructura del **MNet2**, especialmente por la señal singlete (4H) a 3.57 ppm característica de $Ar-CH_2-NR_2$.

La síntesis de ambos elementos precursores, **BSP** y **BSNet2** (**Figura 32** y **Figura 33**), se llevó a cabo a través de una reacción de acoplamiento C-C catalizada por paladio, tipo Suzuki-Miyaura, entre los correspondientes haluros de arilo (**3.1** y **MNet2**) y el borano comercial (**3.2**). Se obtuvo un rendimiento mucho mayor en el caso de **BSP** atribuible a que este tipo de reacciones funcionan mejor cuando el acoplamiento se lleva a cabo con un precursor yodado.⁷⁸

En el espectro 1H -RMN de la molécula **BSNet2** (**Figura 165** en el anexo, p. 261) se observan las señales de los hidrógenos alifáticos a 3.69 ppm, 2.60 ppm y 1.10 ppm, cuyas integrales y multiplicidad encajan perfectamente con la estructura del **BSNet2**. Del mismo modo, las señales de los protones olefínicos (7.73 ppm y 7.03 ppm), con un valor de la constante de acoplamiento de ~16 Hz característico de un acoplamiento en *trans*, junto con el valor de sus integrales y de las integrales señales aromáticas y alifática, muestran total concordancia con la estructura del **BSNet2**.

En el capítulo 4 se hablará más detalladamente sobre la reacción de Suzuki-Miyaura, reacción empleada para la síntesis de todos los polímeros conjugados luminiscentes realizados en esta Tesis.

4.1.2. Síntesis de elementos precursores para la detección del anión carboxilato

Como ya se hizo mención en el apartado 2.2 (p. 99), uno de los grupos funcionales más empleados en la elaboración de receptores para iones carboxilato son las ureas y tioureas, siendo estas últimas más sensibles, en general, debido a la mayor acidez de sus enlaces NH.⁵⁶ De entre todas las micotoxinas citadas en la introducción de esta Tesis, son la citrinina (CT), la ocratoxina A (OTA) y la fumonisina B₁ (FB₁), las que se caracterizan por la presencia de grupos carboxilo en sus estructuras (**Figura 35**).

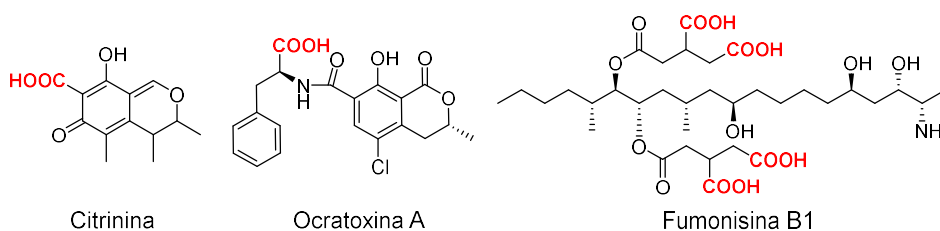


Figura 35. Estructuras de diferentes micotoxinas carboxílicas, resaltando en rojo el grupo funcional.

Como se observa en la **Figura 36**, la interacción direccional receptor/analito a través de dos enlaces de hidrógeno da lugar a un “anillo” de 8 miembros especialmente estable.

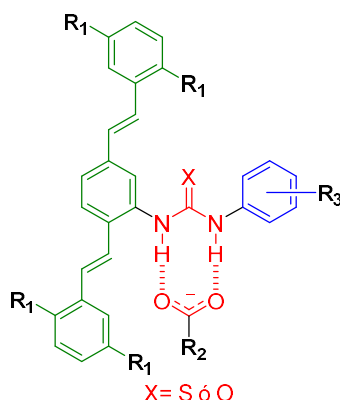


Figura 36. Esquema genérico de la interacción entre las unidades precursoras de tipo urea/tiourea fluorescentes sintetizados en esta Tesis y el ion carboxilato, donde R₁ hace referencia a los diferentes sustituyentes que puede poseer la cadena principal y que pueden afectar a las propiedades ópticas y reconocimiento de la sonda, R₂ representa las diferentes estructuras posibles de carboxilatos y R₃ los sustituyentes de la aril-urea/tiourea, que modulan directamente su capacidad dadora de hidrógeno.

En un primer lugar se procedió al intento de preparación de elementos precursores derivatizados con el grupo tiourea (desafortunadamente sin éxito a pesar de que se probaron distintas aproximaciones, **Figura 37**):

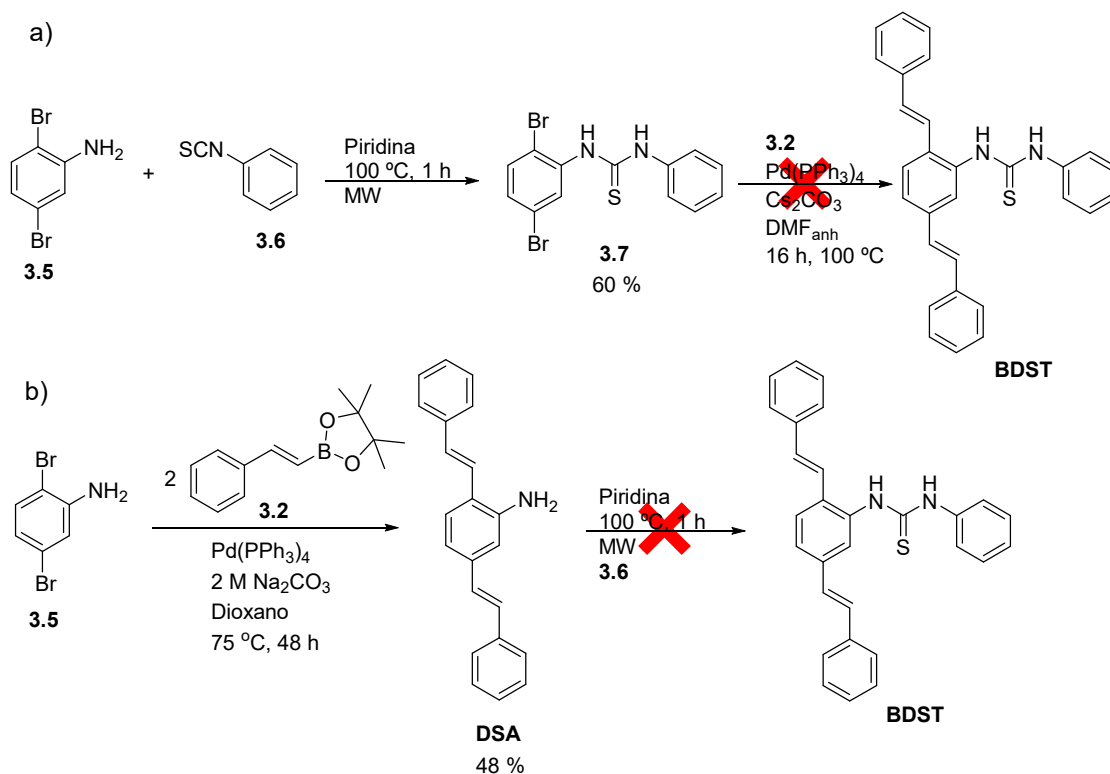


Figura 37. Dos intentos fallidos de obtención del derivado de tiourea BDST.

Por una parte se procedió a la síntesis de la tiourea (**3.7**) partiendo de los precursores comerciales 2,5-dibromoanilina (**3.5**) y fenilisotiocianato (**3.6**) (**Figura 37**). Inicialmente se probaron unas condiciones de síntesis suaves, empleando THF a temperatura ambiente pero, debido a la escasa reactividad de la amina aromática, no se obtuvieron resultados y fue necesario el uso de un reactor de microondas, elevadas temperaturas, además del empleo de una base como disolvente de la reacción. A continuación, se describen todos los procedimientos infructuosos (a-e) que se ensayaron para la obtención de la molécula **3.7**, resultando únicamente exitoso el f).

- a) THF, ta, 24 – 48 h
- b) THF, 70 °C, 24 – 48 h
- c) DMF, piridina, 90 °C, 24 – 48 h
- d) DMF, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO), 155 °C, 24 – 48 h
- e) Piridina, 80 °C, 24 – 48 h
- f) Piridina, 100 °C, 1 h, MW

Sintetizada la tiourea (**3.7**), lo cual se pudo confirmar por la presencia de las señales características de los grupos NH-tiourea por ^1H -RMN en DMSO- d_6 a 10.13 ppm y 9.44 ppm (**Figura 167** en el anexo, p. 262), se procedió a la incorporación de los grupos estirilo mediante

una reacción de acoplamiento tipo Suzuki-Miyaura. Aunque se probaron diferentes procedimientos, las condiciones básicas de todas ellas provocaban la hidrólisis de la tiourea.

Para evitar la hidrólisis del grupo tiourea, se planteó sintetizar primero la cadena de estirenos y seguidamente la tiourea, con las condiciones de reacción ya optimizadas (**Figura 37b**). Se sintetizó en primer lugar la molécula **DSA**, con un rendimiento del 48 %. En el espectro de ^1H -RMN en DMSO-d_6 (**Figura 169** en el anexo, p. 263) se observa un singlete ancho a 5.44 ppm correspondiente al grupo amino que integra a 2H. El resto de señales no se pudieron identificar, pero si se observa que el multiplete de la parte aromática integra 17H, número total de hidrógenos aromáticos esperados. Por espectrometría de masas de alta resolución se detectó el pico molecular $[\text{M}]^+$ a 297.1518 (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}^+$ 297.1517). Lamentablemente el último paso para la formación de la tiourea no tuvo lugar, lo que se atribuye a la disminución de la nucleofilia de los electrones del nitrógeno en la molécula **DSA**, fuertemente conjugados con la cadena de estirenos, además del impedimento estérico que provoca el grupo estirilo en *orto*.

Debido a las complicaciones que presentó la síntesis de tioureas, se decidió probar la preparación de ureas, ya que los isocianatos empleados para su síntesis suelen ser más reactivos que los correspondientes isotiocianatos. En la **Figura 38** se muestra la síntesis de la urea **3.9** a partir del isocianato de 4-nitrofenilo comercial (**3.8**). Esta reacción se llevó a cabo para optimizar las condiciones de reacción que se emplearían después para la síntesis de la urea **BDSNU** (**Figura 39**), evitando el gasto innecesario de **DSA**. Así, en lugar de **DSA**, se empleó la amina comercial **3.5**. Partiendo de las condiciones establecidas en la síntesis anterior (piridina, 100 °C, MW, 1 h **Figura 37**) no se pudo obtener la urea deseada. Otras condiciones de reacción que se probaron fueron piridina/80 °C/24 – 48 h y DMF/piridina/100 °C/24 – 48 h.

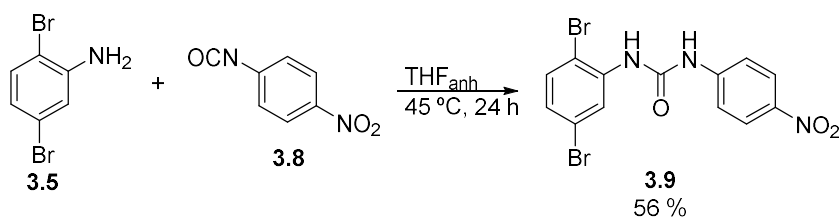


Figura 38. Procedimiento seguido para la obtención de la nitrofenilurea **3.9**.

Finalmente, se consiguió obtener el producto deseado **3.9** empleando THF y calentando suavemente a 45 °C. La estructura se confirmó por la presencia de las señales NH de la urea a 10.25 ppm y 8.47 ppm en el espectro de ^1H -RMN (**Figura 171** en el anexo, p. 264). El uso de un isocianato, más reactivo que los isotiocianatos, junto con la presencia del grupo nitro en *para* que aumenta la electrofiliidad de este, permitió suavizar las condiciones de reacción.

Empleando estas mismas condiciones, se hizo reaccionar la diestirilamina **DSA** con el isocianato comercial (**3.8**), obteniendo el bloque precursor **BDSNU** (**Figura 39**). La confirmación de la molécula obtenida se llevó a cabo, tanto por espectrometría de masas encontrando el pico molecular $[M+Na]^+$ a 484.2 (calculado para $C_{29}H_{23}N_3O_3Na^+$ 484.2), como por resonancia magnética nuclear de protón en DMSO- d_6 (**Figura 174** en el anexo, p. 266) que muestra los NH de la urea a 9.73 ppm y 8.63 ppm. Las señales correspondientes a los dobles enlaces aparecen camufladas entre la señales de los bencenos terminales. Sí se identificaron, no obstante, dos de las señales del anillo central (un doblete a 8.21 ppm y un singlete a 7.98 ppm).

Figura 39. Procedimiento utilizado para la obtención del bloque precursor urea BDSNU.

Para evitar el efecto desactivante de la fluorescencia producido por el grupo nitro, se procedió a la sustitución del nitrofenilisocianato (**3.8**) por el 3,5-bis(trifluorometil)fenil isocianato (**3.10**, **Figura 40**), el cual también posee grupos fuertemente electroattractores (CF_3) pero no provocan la desactivación de la luminiscencia.⁷⁹ Se obtuvo así un sólido blanco insoluble en THF a temperatura ambiente, que se purificó fácilmente por lavado con THF. Se preparó el bloque precursor fluorescente **BDSU** con un muy buen rendimiento (84 %), sin necesidad de purificarlo por cromatografía en columna. La estructura de la molécula se confirmó por espectrometría de masas de alta resolución, en la que se detectó el pico molecular $[\text{M}]^+$ a 552.1613 (calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}^+$ 552.1636). Además, por ^1H -RMN, se observan las señales inequívocas de la urea a 9.66 ppm y 8.66 ppm en DMSO-d_6 (para ralentizar el intercambio protónico; **Figura 176** en el anexo, p. 267).

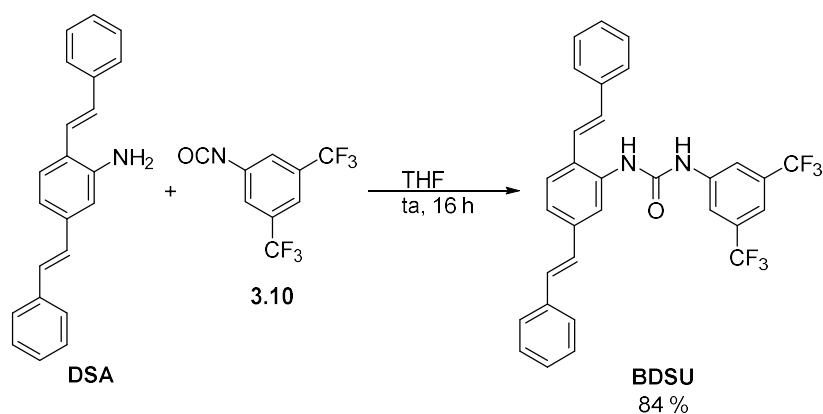


Figura 40. Reacción de formación de la urea fluorescente BDSU por condensación de la amina DSA con el isocianato comercial 3.10.

Otra ruta alternativa para la síntesis del **BDSU** se muestra en la **Figura 41**. Se sintetizó, en un primer paso, la molécula **MU**. Los problemas de solubilidad de la urea **MU** hicieron que se tuvieron que introducir pequeños cambios en las condiciones para el acoplamiento Suzuki-Miyaura. Así, se empleó DMF en vez de dioxano y se modificó la base por Cs_2CO_3 que presenta mayor solubilidad que otros carbonatos (como el K_2CO_3 o el Na_2CO_3) en DMF. Se obtuvo la urea fluorescente **BDSU** con un 30 % de rendimiento global. Al contrario que lo sucedido con la tiourea **BDST** se demuestra que, en este caso, la urea sí resiste las condiciones de reacción para la introducción de los grupos estirilo sin hidrolizarse (**Figura 37a**).

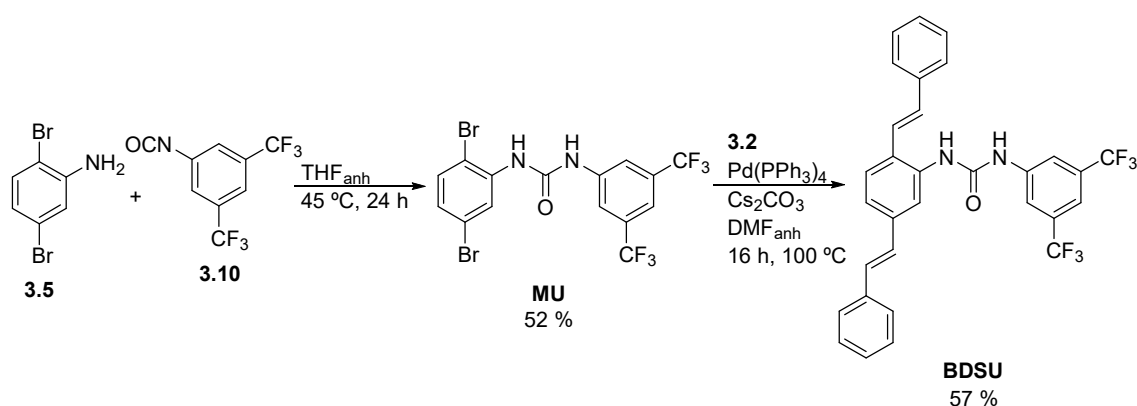


Figura 41. Procedimiento para la obtención del bloque precursor BDSU a través de un acoplamiento catalizado por paladio tipo Suzuki.

Una vez obtenido el primer bloque precursor basado en un grupo urea, comprobada su luminiscencia y su respuesta a la presencia de iones carboxilato (resultados discutidos en el siguiente apartado), se procedió a la síntesis de los elementos precursores con grupos metóxido como grupo dador de electrones (**BMSU**) o metoxycarbonilo como grupo aceptor de electrones (**BPSU**).

Alternativamente, se planteó la ruta descrita en la **Figura 43**, basada en el mismo procedimiento seguido para la síntesis de los monómeros de CLPs⁸³ descrita en el apartado “Síntesis de monómeros estructurales” del capítulo 4 (**Figura 80**, p. 168). El bromuro de arilo **3.11**, pese a su similitud con el **dIB** (1,4-diiodo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno), sintetizado en el artículo referenciado y en el capítulo 4, no respondió a las condiciones de reacción allí descritas. Esto puede ser debido a la menor reactividad relativa de los bromuros de arilo comparados con los yoduros. Fueron necesarias unas condiciones más drásticas: se aumentó tanto la temperatura como los tiempos de reacción y se llevó a cabo la reacción empleando la base como disolvente. Se obtuvo así el derivado silil-etinilado **3.14** (**Figura 43**). El grupo silano se eliminó sin problema con KOH en MeOH para obtener el arilacetileno **3.15**. Haciendo uso de la síntesis con microondas se pudo obtener el boronato **3.13** con un rendimiento del 93 %.

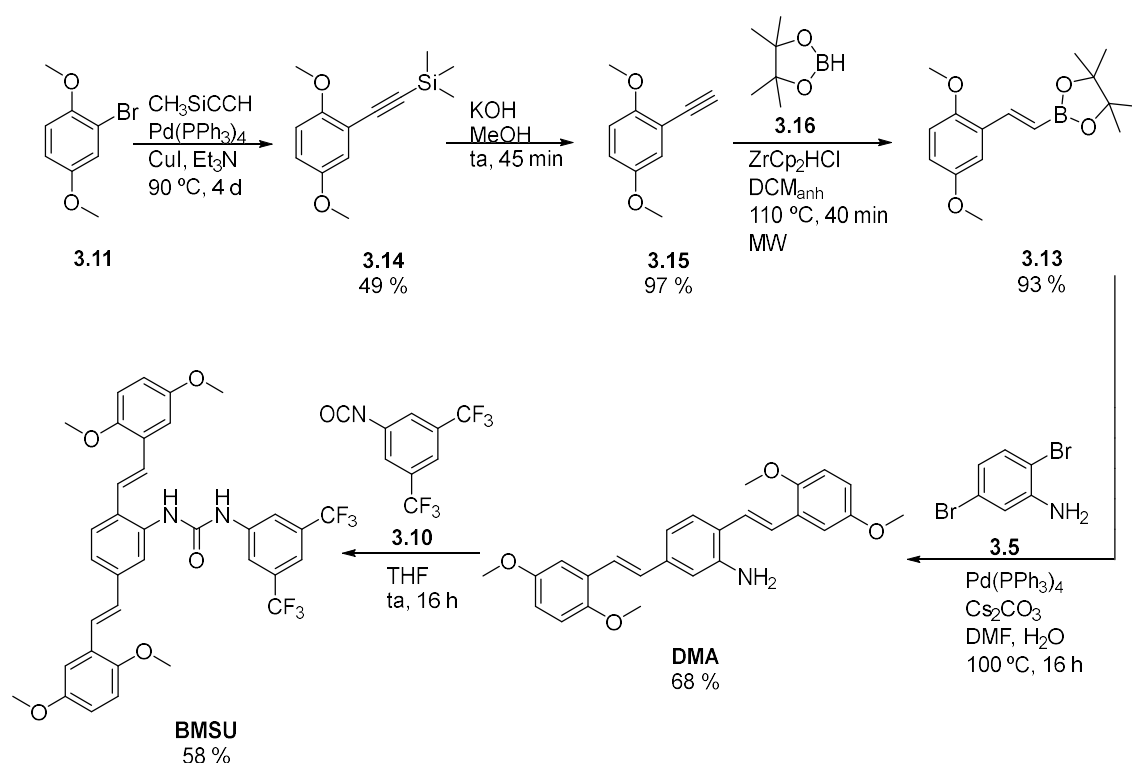


Figura 43. Procedimiento para la obtención del bloque precursor diestirilfenilurea con grupos electrodadores BMSU.

Para la obtención de la molécula **DMA** a través de un acoplamiento tipo Suzuki, se utilizaron las mismas condiciones que las empleadas para la síntesis de la urea fluorescente **BDSU** descritas en la **Figura 41**. En este caso, al no existir la posibilidad de hidrólisis, se añadió agua al medio para facilitar la disolución de la base y favorecer así la reacción. El espectro de resonancia magnética de protón de la anilina **DMA** resultó ser muy complejo, pudiendo identificar únicamente las señales correspondientes a los hidrógenos de la amina que aparecen como un singlete ancho alrededor de 5.3 ppm y el multiplete que aparece en 3.8 ppm debido a los hidrógenos de los grupos metóxido (**Figura 185** en el anexo, p. 272). Fue necesaria la confirmación de la molécula por espectrometría de masas de alta resolución, en la que se detectó el pico molecular $[\text{M}]^+$ a 417.1924 (m/z calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_4^+$ 417.1940) (**Figura 187** en el anexo, p. 273).

Finalmente, la formación de la urea fluorescente **BMSU** se llevó a cabo en THF a temperatura ambiente. En este caso la urea resultante no precipitó en THF y fue necesaria su purificación por cromatografía en columna. De nuevo las señales pertenecientes a los grupos NH de la urea que aparecen a 9.64 ppm y 8.61 ppm fueron claves para la identificación de la molécula (**Figura 188** en el anexo, p. 274). Las integrales de estas señales correspondían perfectamente con los hidrógenos de los $-\text{OCH}_3$ que aparecen alrededor de 3.7 ppm, así como con los singletes

correspondientes al anillo aromático con grupos $-\text{CF}_3$ a 8.15 ppm y 7.88 ppm. La espectrometría de masas de alta resolución también confirmó la formación de la diarilurea **BMSU**: $[\text{M}]^+$ a 672.2055 (calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_5^+$ 672.2059) (**Figura 189** en el anexo, p. 274).

Con el objetivo de simplificar la ruta de síntesis de la urea **DMA** en cuatro pasos descrita en la **Figura 43**, se propuso una ruta alternativa de solo dos pasos (**Figura 44**). Pese a que el rendimiento global para la obtención de **DMA** con esta nueva ruta es del 16 % (hay que tener en cuenta el rendimiento del 58 % para la síntesis de **DVA**) frente al 30 % de la ruta anterior, esta resulta ser mucho más rápida, con menos pasos de purificación y proporciona una **DMA** más pura.



Figura 44. Procedimiento para la obtención de la amina fluorescente con grupos dadores de electrones **DMA** llevada a cabo por medio de un acoplamiento catalizado por paladio de tipo Heck.

Para la síntesis de la anilina **DPA** se intentó, en primer lugar, preparar el boronato **3.18** (**Figura 45a**). Pese a que la presencia de grupos atractores de electrones en el monómero donde se debe producir la adición oxidativa tendría que facilitar la reacción, esta no tuvo lugar. Por ello se modificaron las condiciones para favorecer un acoplamiento tipo Suzuki (**Figura 45b**), mucho más reactiva que la vía Heck empleada para obtener el boronato **3.18**. Se obtuvo así el estireno **3.19** con un rendimiento superior al 90 %. En el espectro de ^1H -RMN (**Figura 190** en el anexo, p. 275) se observa el doble doblete del CH del doble enlace que aparece a 7.41 ppm y que muestra dos constantes de acoplamiento: 17 Hz (*trans*) y 11 Hz (*cis*). Se intentó a continuación sintetizar la urea correspondiente empleando el estireno **3.19** obtenido y la anilina comercial **3.5**, llevando a cabo una reacción tipo Heck entre el doble enlace y el bromo. Se ensayaron varias condiciones: a) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, P(o-tolyl) , $(i\text{-Pr})_2\text{NH}$, dioxano, 90 °C, 24 h; b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, P(o-tolyl) , Et_3N , 110 °C, 24 h; c) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CsCO_3 , DMF, H_2O , 120 °C, 6 min, MW, obteniendo únicamente la anilina fluorescente **DPA** en pequeñas cantidades cuando se empleó $(\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4, \text{Cs}_2\text{CO}_3, \text{dioxano}, 100^\circ\text{C})$ (3d). Ante esto, se procedió a adaptar la ruta descrita en la **Figura 43** pero partiendo de un bromuro de arilo **3.17** con grupos $-\text{COOMe}$ (**Figura 46**) en lugar de $-\text{OMe}$.

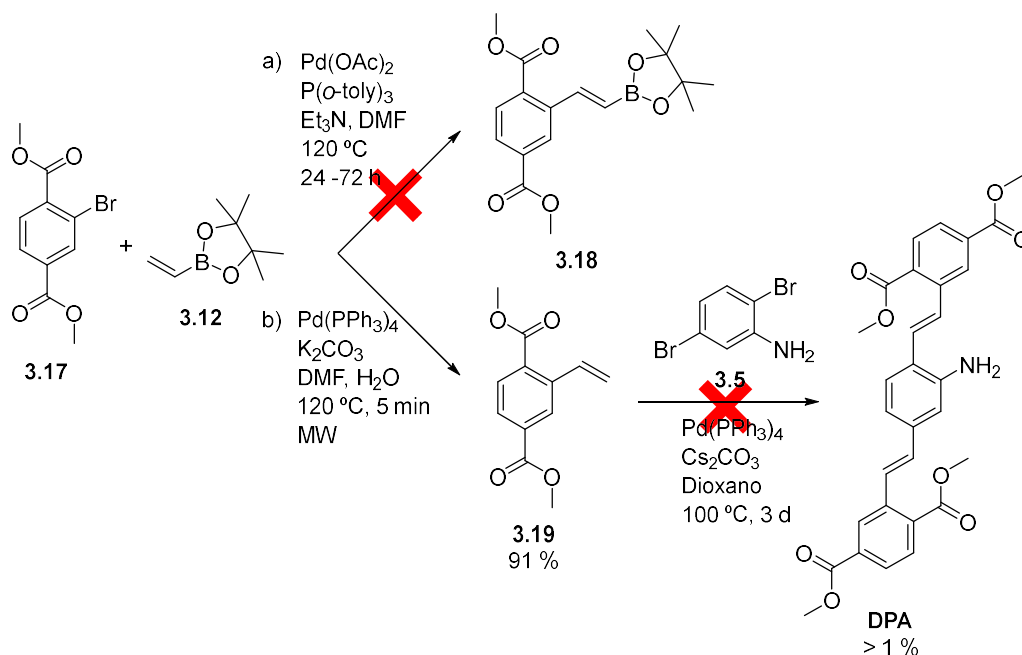


Figura 45. Procedimiento seguido para el intento obtención de DPA que resultó infructuoso.

Como se describe en la **Figura 46**, el primer paso consistió de nuevo en la incorporación del triple enlace por medio de un acoplamiento C-C tipo Sonogashira para dar lugar al trimetilsililacetileno **3.20**. Aunque la presencia de grupos pobres en electrones consiguió reducir el tiempo de reacción a 4 días (síntesis de **3.14** **Figura 43**), gracias a la síntesis asistida por microondas se consiguió acortar los tiempos de reacción a tan solo 30 min. La obtención del trimetilsililacetileno **3.20** se puede confirmar fácilmente por la señal de los metilos del silano que aparecen en el espectro de ^1H -RMN a 0.24 ppm (**Figura 192** en el anexo, p. 276), señal que en la posterior eliminación del grupo silano en medio básico desaparecía confirmando la obtención del acetileno **3.21** (**Figura 194** en el anexo, p. 277). En este caso, la hidrólisis en medio básico podía producir la hidrólisis del grupo éster, por lo que se empleó como base K_2CO_3 , más débil que el KOH, diluida y se redujeron los tiempos de reacción a 5 min.

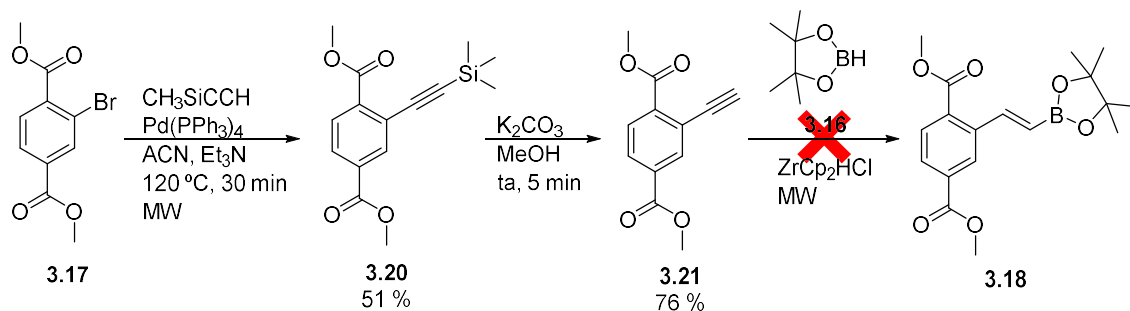


Figura 46. Intento fallido de obtención del éster borónico con grupos electroaceptores 3.18.

Lamentablemente, la hidroboración del triple enlace para producir el boronato **3.18** resultó infructuosa. La presencia de grupos electroattractores en la molécula parece ser determinante en este tipo de reacción. A pesar de que el mecanismo de reacción del [cloridobis(η^5 -ciclopentadienil)hidrido]zirconio(IV) (reactivo de Schwartz, ZrCp_2HCl) no está completamente elucidado,⁸⁴ en la realización de esta Tesis se ha observado que: i) la hidroboración de los etinilbencenos con sustituyentes electrodonadores (**3.15** y **4.6**) tuvo lugar con buenos rendimientos; ii) el rendimiento de la hidroboración del etinilbenceno sin sustituyentes (**4.9**) disminuye significativamente a un 10 % y iii) la hidroboración del etinilbenceno con sustituyentes electroattractores (**3.21**) no tiene lugar. Pese a estas observaciones, este resultado no se ha podido corroborar con datos de la bibliografía, donde estudios parecidos muestran una gran disparidad de resultados.⁸⁵⁻⁸⁷

En un último intento se planteó repetir la reacción de Heck descrita en la **Figura 45b** (síntesis de la **DPA**), pero siendo esta vez la dibromoanilina comercial (**3.5**) la que contuviese el doble enlace y el haluro de arilo (**3.17**) fuera la molécula con los grupos electroaceptores (**Figura 47**). Se escogieron unas condiciones de reacción que propiciasen el acoplamiento vía Suzuki del vinilboronato **3.12** con la 2,5-dibromoanilina, obteniendo la anilina **DVA** con un 58 % de rendimiento. El ^1H -RMN de **DVA** en DMSO-d_6 mostraba un singlete ancho 3.80 correspondiente al grupo amino y dos dobletes de dobletes alrededor de 5.5 ppm correspondientes a los dobles enlaces (**Figura 183** en el anexo, p. 271). La divinilanilina **DVA** es especialmente inestable y polimeriza fácilmente: ha de guardarse en oscuridad y a bajas temperaturas, y emplearse lo antes posible. Por medio de un acoplamiento tipo Heck entre la **DVA** y el bromuro de arilo comercial **3.17** se pudo obtener finalmente la diestirilnilina **DPA**, aunque con un rendimiento muy bajo (14 %). En este caso, debido a la escasez de producto, no se realizó el ^1H -RMN en DMSO-d_6 sino en CDCl_3 (**Figura 196** en el anexo, p. 278), para así poder recuperar más fácilmente este intermedio de síntesis. En CDCl_3 no se pudo observar la señal correspondiente al grupo amino. Se empleó entonces como unidad de integración la señal que aparecía a 3.96 ppm, correspondiente a los metilos del grupo $-\text{COOMe}$, integrándola a 12 hidrógenos. Todas las señales aromáticas (que no se pudieron asignar) integraban correctamente. La obtención de **DPA** se confirmó por espectrometría de masas de alta resolución, en la que se detectó el pico molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 530.1795 (calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{NO}_4^+$ 530.1809).

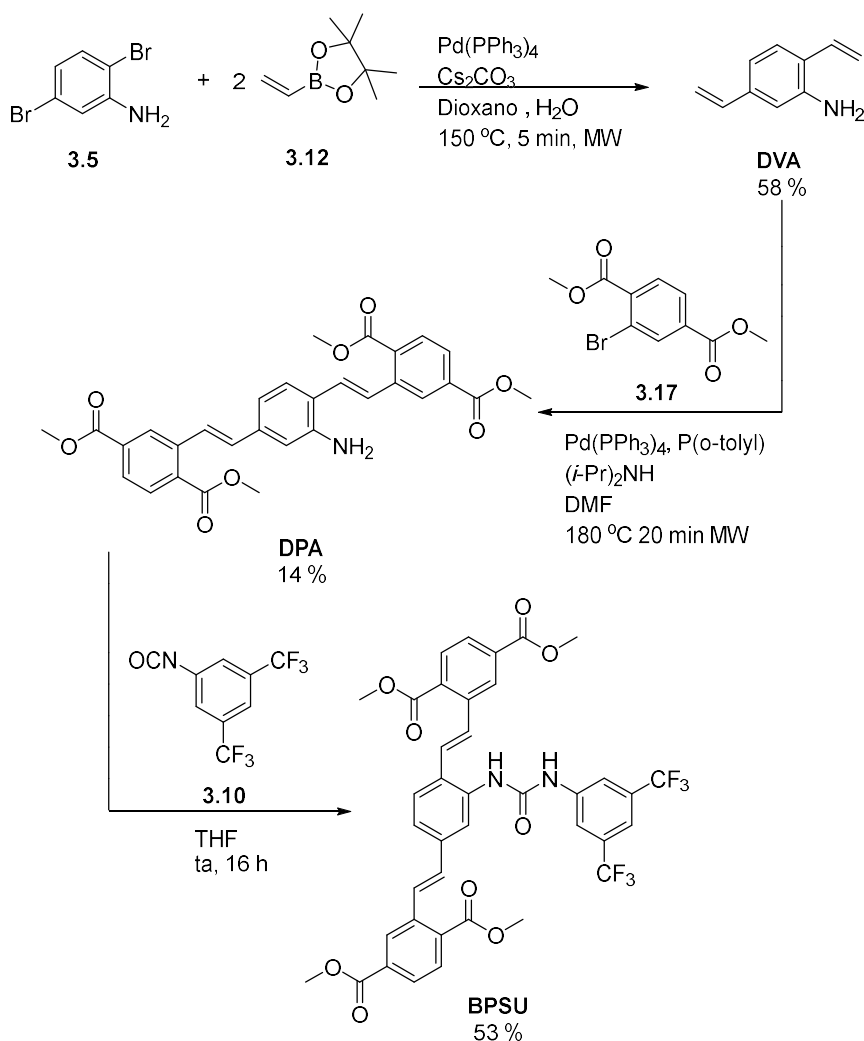


Figura 47. Procedimiento para la obtención del bloque precursor urea con grupos electroattractores BPSU.

Finalmente, la anilina **DPA** se hizo reaccionar con el isocianato de arilo **3.10** en THF a temperatura ambiente y, tras la purificación del crudo por cromatografía en columna, se obtuvo un polvo amarillo correspondiente al bloque precursor diarilurea (**BPSU**) fluorescente con grupos electroaceptores. Su obtención se confirmó por espectrometría de masas de alta resolución, en la que se detectó el pico molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a una masa de 817.1721 (calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{30}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}^+$ 817.1742). De nuevo las señales pertenecientes a los grupos NH de la urea que aparecen a 9.63 ppm y 8.77 ppm fueron claves para la identificación de la molécula. Las integrales de estas eran compatibles con los hidrógenos de los grupos $-\text{COOMe}$ que aparecen alrededor de 3.9 ppm, así como los dobletes correspondientes a los dobles enlaces que aparecen en torno a 8.37 ppm y 7.35 ppm, con unas constantes de acoplamiento de 15.9 Hz de tipo *trans* (**Figura 198** en el anexo, p. 279).

Como se habrá dado cuenta el lector, en esta sección se ha abordado la síntesis de una gran variedad de elementos precursores para su aplicación en la detección de diferentes analitos. Para ello se han empleado diferentes reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio, destacando la reacción de Suzuki-Miyaura, además de las de Heck y Sonogashira. Las tres siguen un ciclo catalítico similar —descrito con mayor detalle para la reacción de Suzuki-Miyaura en el capítulo 4 de esta Tesis (ver **Figura 76**, p. 161)—, en el cual el paso limitante de la reacción suele ser la adición oxidativa.⁸¹⁻⁸³ Aunque la principal limitación de este paso viene dada por el grupo saliente (obteniendo mejores resultados con el yodo que con otros haluros como bromo o cloro),^{78,88} esta suele estar desfavorecida por la presencia de grupos ricos en electrones unidos al anillo aromático.⁸⁹ Así se pudo observar en la síntesis de los ariletinil silanos **3.14** (–OMe tiempo de reacción 4 días) y **3.20** (–COOMe tiempo de reacción 1 día) a través de una reacción tipo Sonogashira. Lo mismo sucedió para la síntesis de la anilina **DVA** y del estireno **3.19** por medio de la reacción de Suzuki-Miyaura entre el éster borónico **3.12** y los respectivos bromoderivados **3.5** y **3.17**. Así la **DVA**, con grupos ricos en electrones, se obtuvo con un 58 %, mientras que el rendimiento del compuesto **3.19**, con grupos aceptores de electrones, ascendió hasta el 91 %. También, en la síntesis de la anilina **DPA** a través de un acoplamiento de Heck, se observó que cuando el monómero bromado contenía el grupo amino, de fuerte efecto electrodonador, esta no tenía lugar y cuándo se introdujeron los grupos –COOMe en el haluro de arilo, sí se obtuvo la molécula deseada.

Por otra parte y como se ha discutido anteriormente, la presencia de grupo deficitarios en electrones parece ser que tiene el efecto contrario a la hora de llevar a cabo la hidroboración del triple enlace. El mecanismo de esta reacción no está confirmado todavía y, por ello, en bibliografía se puede encontrar cierta controversia con trabajos en los que la reacción se ve favorecida por grupos deficitarios en electrones.⁸⁴⁻⁸⁷

También se ha podido observar la mayor reactividad de la reacción de Suzuki-Miyaura respecto a la de Heck.⁸⁰ En la síntesis de la anilina **DMA** se probaron ambas rutas: Suzuki-Miyaura (**Figura 43**) y Heck (**Figura 44**). Pese a que en la primera ruta el grupo amino, de mayor efecto electrodonador que el metóxido, se encuentra en la molécula donde se produce la adición oxidativa y, por tanto, donde los grupo electrodonadores influyen negativamente, el rendimiento fue más del doble (68 %) que el obtenido por la vía Heck (27 %). Un comportamiento parecido se observó en la síntesis del estireno **3.19**. Cuando se hizo reaccionar con la dibromoanilina para conseguir un acoplamiento vía Heck (**Figura 45a**) no se obtuvo resultado alguno pero, al modificar la base, el catalizador y el disolvente y hacerlos más acordes con una reacción tipo Suzuki-Miyaura, se obtuvo la molécula objetivo con un 91 % de rendimiento.

Pese a estas observaciones generales, la predicción no se cumplió en la obtención de las anilinas **DPA** y la **DMA** por acoplamiento Heck entre la **DVA** y los haluros de arilo correspondientes. Así el halobenceno **3.17** con grupos pobres en electrones, proporcionó un rendimiento de casi la mitad (14 %) del que se obtuvo al hacer reaccionar el halobenceno **3.11** que posee grupos ricos en electrones (27 %).

Así, la elección no sólo de la ruta a seguir, sino también de la base, el disolvente o el catalizador, son de suma importancia a la hora de llevar a cabo un acoplamiento C–C catalizado por paladio, por lo que la obtención con éxito de una molécula puede venir determinada por la disposición de los grupos funcionales. Por ello, se hace necesaria en cada caso concreto llevar a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica que pueda determinar las mejores condiciones para obtener el producto deseado y, pese a esto, no siempre se cumplen las tendencias generales.

4.2. Caracterización por espectroscopía de absorción y fluorescencia

Finalizada la síntesis de los diferentes elementos precursores de CLPs, se procedió a su caracterización espectroscópica. Los diferentes elementos precursores se disolvieron en ACN y se registraron sus espectros de absorción, emisión y excitación. Además, se determinaron sus tiempos de vida de fluorescencia, sus coeficientes de absorción molar $\epsilon(\lambda_{\text{máx}}^{\text{ABS}})$ y sus rendimientos cuánticos de fluorescencia por el método relativo, utilizando como estándar sulfato de quinina en HClO_4 ($\Phi_f = 0.60 \pm 0.04$).⁹⁰

a) Caracterización del 1,4-diestirilbenceno (**DSB**)

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización espectroscópica del **DSB**. Este se encuentra ampliamente descrito en bibliografía⁹¹⁻⁹² ya que es el oligómero de poli(*p*-fenilenvinileno) (**PPV**) más corto que posee buenas propiedades de emisión de luz.⁹³ A diferencia del estilbena, el rendimiento cuántico de fluorescencia del **DSB** es elevado y su rendimiento cuántico de isomerización insignificante.⁹⁴

La **Figura 48** muestra los espectros de absorción, emisión y excitación del **DSB** disuelto en acetonitrilo. Las bandas de absorción (349 nm) y de emisión (408 nm) son prácticamente una imagen especular, como se espera para una molécula que no sufre grandes distorsiones en su estado excitado. La estructura fina en ambos espectros se debe a los modos de vibración con frecuencias que van desde 1100 a 1400 cm^{-1} , que probablemente corresponden a estiramientos del doble enlace o modos de expansión y contracción del fenilo en la molécula.⁹⁴ Esta estructura vibracional se ve comúnmente en la familia de moléculas fenilen-vinileno.⁹⁵⁻⁹⁶

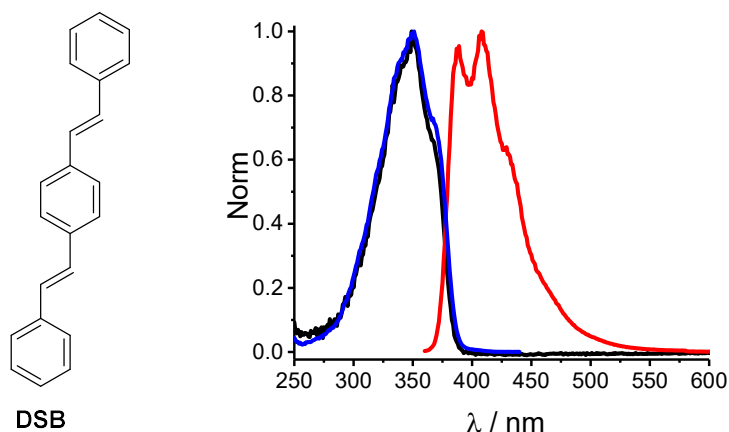


Figura 48. Izquierda: estructura molecular del DSB, núcleo común del resto de elementos precursores de CLPs. Derecha: espectros normalizados del DSB en ACN: en negro el espectro de absorción, en azul el excitación (λ_{EM} 410 nm) y en rojo el de emisión (λ_{EXC} 350 nm).

Sobre la estructura del **DSB** se fueron realizando pequeños cambios para estudiar la posible aplicación de estas nuevas sondas en el campo de los sensores químicos. Para ello se llevaron a cabo dos aproximaciones: i) adición de grupos básicos en las posiciones 3 y 6 para el reconocimiento de las micotoxinas en su forma de ácido carboxílico y ii) adición de un grupo urea en la posición 3 para estudiar el reconocimiento de las micotoxinas en forma de anión carboxilato. Con este fin se emplearon los siguientes analitos modelo: 1) el ácido trifluoroacético (TFA), un ácido orgánico fuerte; 2) el anión acetato en forma de sal de tetrabutilamonio, soluble en disolventes orgánicos; y 3) el anión fluoruro, una base fuerte en disolventes orgánicos, también en forma de sal de tetrabutilamonio.

El diestirilo **DSB** se utilizó como modelo. Así, se confirmó que no presentaba respuesta alguna a cualquiera de los analitos citados (a un nivel de concentración de aproximadamente 1 mM de cada uno de los analitos), tal y como cabía esperar.

b) Caracterización de los elementos precursores para el reconocimiento de ácidos carboxílicos

Con el fin de utilizar las interacciones ácido-base para el reconocimiento molecular de las toxinas de interés, se añadieron diferentes unidades básicas que pudieran interaccionar con los analitos todos ellos de carácter ácido.

Por una parte, se introdujeron en las posiciones 3 y 6 de la estructura básica del **DSB** (**Figura 48**) dos aminas terciarias, unidas por un espaciador CH_2 al grupo benceno obteniendo la molécula anteriormente descrita **BSNet2**. Por otra, para la obtención de la piridina **BSP**, el anillo bencénico central de la molécula **DSB** se sustituyó por una piridina, añadiendo de esta forma un nitrógeno

en la posición 3 (**Figura 48**). En la **Figura 49** se pueden observar ambas estructuras junto con sus espectros de absorción, emisión y excitación.

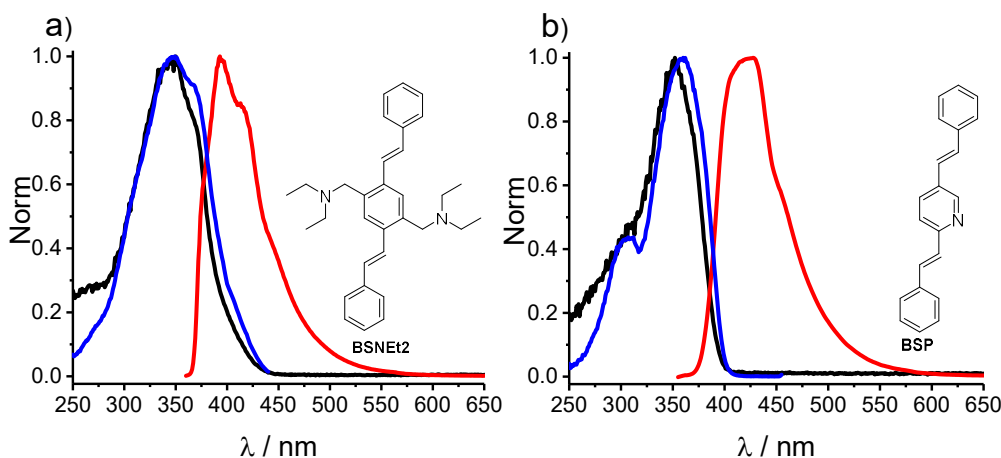


Figura 49. Espectros normalizados de los elementos precursores de CLPs BSNEt2 y BSP en ACN. En negro el espectro de absorción, en azul el de excitación y en rojo el de emisión: a) BSNEt2: λ_{exc} 350 nm, λ_{em} 475 nm; b) BSP: λ_{exc} 350 nm, λ_{em} 460 nm.

A la vista de las diferentes curvas (**Figura 49**) se observa la similitud de todos los espectros en torno a la estructura básica de la molécula **DSB** (**Figura 48**). Las tres moléculas presentan su máximo de absorción alrededor de 350 nm. En el espectro de emisión se observa que la estructura fina del **DSB** se difumina en la **BSNEt2** (**Figura 49a**), mientras que para la piridina **BSP** (**Figura 49b**) desaparece por completo, permaneciendo el máximo de emisión prácticamente constante en el caso de **BSNEt2** al no encontrarse los grupos dietilamino conjugados con el fluoróforo, mientras que, en el caso del **BSP**, se observa un desplazamiento batocrómico de unos 20 nm.

Una vez caracterizadas ambas moléculas, se procedió a valorar la respuesta del bloque precursor **BSNEt2** frente a la adición de un ácido orgánico fuerte. La intención de este bloque precursor, donde la amina no se encuentra conjugada a la parte fluorescente de la molécula, es que la interacción del monómero receptor con el analito de interés produjese la protonación de la amina terciaria y que ello conllevara un aumento de la señal luminiscente debido a la inhibición de un posible proceso PET entre los electrones no compartidos del nitrógeno y los estírilos. Desafortunadamente y tras la adición de un gran exceso de TFA (400 eq \approx 0.1 mM), el espectro de fluorescencia no se vio alterado.

En el caso de la piridina **BSP**, tal y como se observa en la **Figura 50b**, sí hubo una pequeña desactivación de la fluorescencia al aumentar la concentración de TFA en la disolución. Sin embargo, al tratarse de una respuesta bastante débil para un ácido tan fuerte, se descartó esta

aproximación y se procedió a ensayar el reconocimiento de las micotoxinas a través de la interacción urea-anión carboxilato.

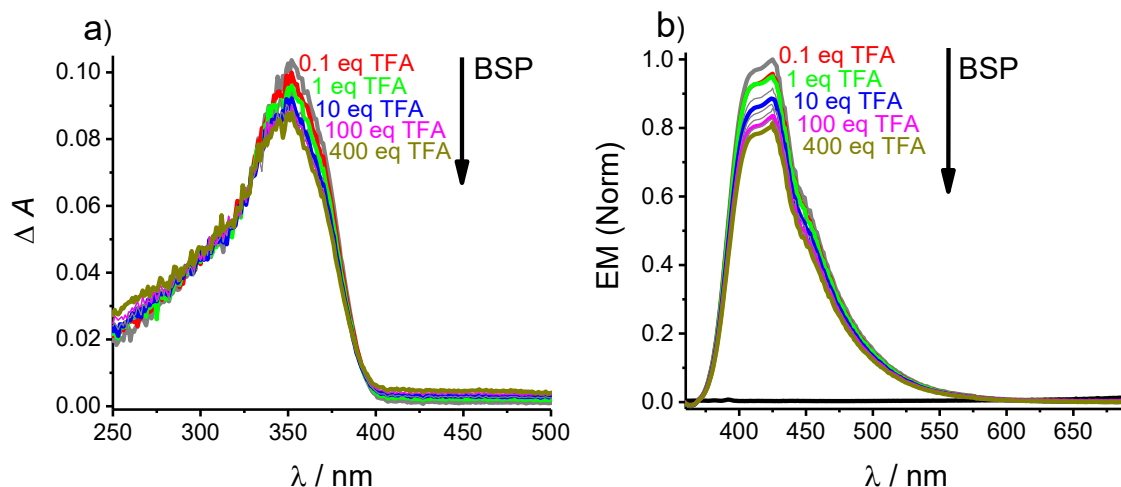


Figura 50. Variación de la señal óptica de la molécula BSP (3.9×10^{-6} M) disuelta en ACN frente a la adición de cantidades crecientes de TFA (de 0 a 400 eq): a) espectro de absorción y b) espectro de emisión (λ_{exc} 350 nm).

c) Caracterización de los elementos precursores para el reconocimiento de aniones carboxilato

Con el objetivo de evaluar la influencia del grupo urea (grupo débilmente electrodonador) en las propiedades ópticas de los distintos derivados del diestirilo **DSB** (**BDSU**, **BMSU** y **BPSU**), también se llevó a cabo la caracterización de las anilinas precursoras correspondientes (**DSA**, **DMA** y **DPA**) con un grupo -NH_2 electrodonador fuerte. La coordinación de aniones carboxilato al receptor urea aumentará el carácter electrodonador del ligando, por lo que es interesante evaluar también dichos derivados de anilina.

Como se observa al comparar las **Figuras 48 y 51** correspondientes a los fluoróforos **DSB** y **DSA**, respectivamente, la introducción del grupo amino (auxocromo) produce un importante desplazamiento batocrómico del máximo de emisión, de 408 nm (**DSB**) a 478 nm (**DSA**). El par electrónico no compartido del grupo amino sería el responsable de este desplazamiento debido a un proceso de transferencia intramolecular de carga (ICT) en el estado excitado, desde el grupo NH_2 al fluoróforo. Vemos, además, que el valor del tiempo de vida de fluorescencia llega duplicarse debido al ICT, el cual a su vez produce una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia. Estos resultados se resumen en la **Tabla 4**.

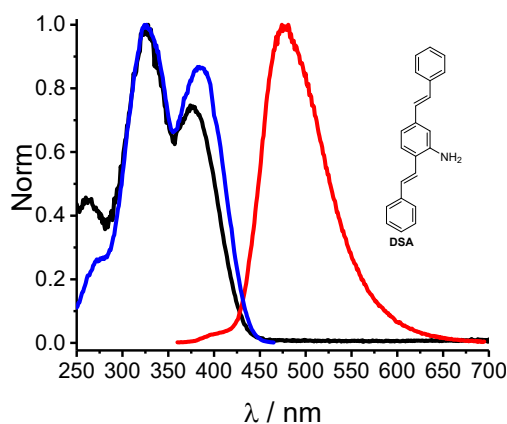


Figura 51. Espectros normalizados de la DSA bloque precursor de CLPs en ACN. En negro, espectro de absorción; en azul, el de excitación (λ_{EM} 475 nm) y en rojo, el de emisión (λ_{EXC} 350 nm).

Por otra parte, como se observa en la **Figura 52** y se recoge en la **Tabla 4**, mientras que la introducción de sustituyentes dadores de electrones (anilina **DMA**) no afectó apenas a sus propiedades ópticas, sí lo hizo de forma significativa en la anilina **DPA**. La adición de los grupos metoxycarbonilo, aceptores de electrones, en las unidades de diestirilo favorece el proceso de transferencia de carga intramolecular, provocando un desplazamiento aun mayor del máximo de emisión y una disminución cercana al 99 % del rendimiento cuántico de fluorescencia. La disminución brusca de éste va acompañada de una disminución importante del tiempo de vida de fluorescencia; además, el perfil cinético de desaparición de la fluorescencia presenta un comportamiento biexponencial, con un componente mayoritario (98 %) de 0.86 ns y uno minoritario (7 %) de 3.35 ns, similar al τ_F obtenido para la anilina **DSA**.

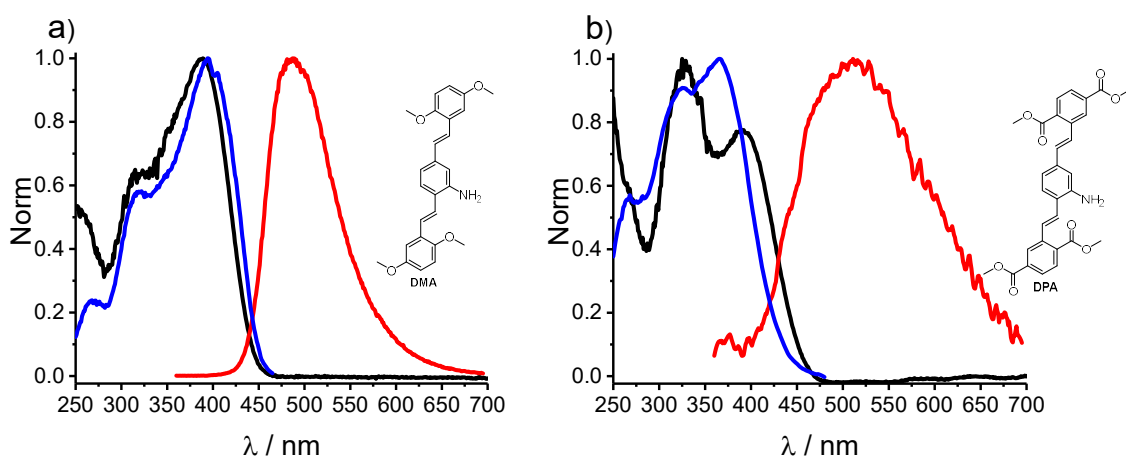


Figura 52. Espectros normalizados de diferentes elementos precursores derivados de anilina de CLPs DMA y DPA en ACN. En negro el espectro de absorción, en azul el de excitación y en rojo el de emisión: a) DMA: λ_{EXC} 350 nm, λ_{EM} 475 nm; b) DPA: λ_{EXC} 350 nm, λ_{EM} 490 nm.

Se evaluó la respuesta de los tres derivados de anilina frente la adición de un analito con grupo carboxilato y de fluoruro. Únicamente se observaron cambios leves para la anilina **DPA**, siendo

prácticamente iguales para acetato y fluoruro (**Figura 53**). En el caso de la **DPA**, la introducción de los grupos electroattractores $-\text{COOMe}$ aumenta el carácter ácido del $-\text{NH}_2$ de la anilina, favoreciendo la interacción ácido-base receptor-analito.

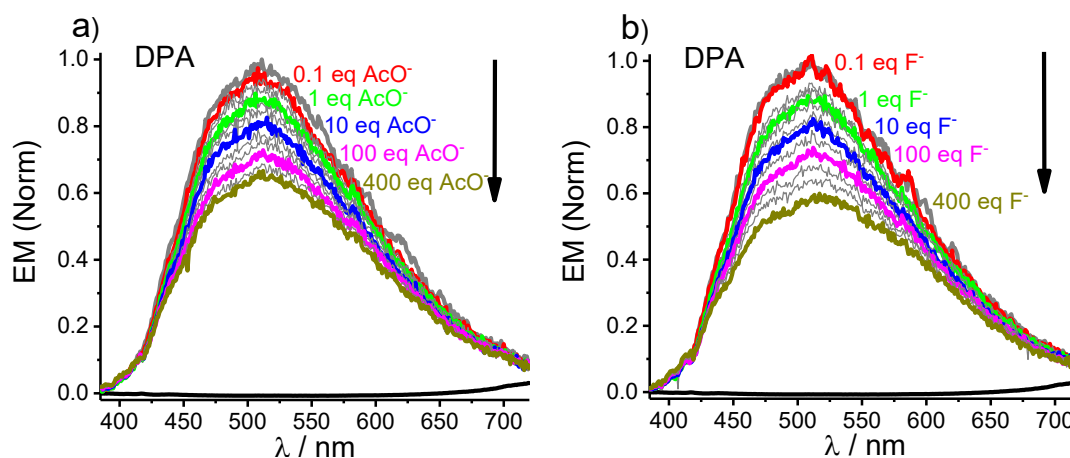


Figura 53. Variación de la señal de fluorescencia de las moléculas DPA (2.0×10^{-6} M, λ_{exc} 370 nm) disuelta en ACN frente a cantidades crecientes del anión a) carboxilato y b) fluoruro.

Finalmente, se llevó a cabo la caracterización de los elementos precursores de CLPs basados en ureas fluorescentes, i.e. la **BMSU** con grupos $-\text{OMe}$ electrodadores en las posiciones 10,10' y 13,13' de la estructura del **DSB**, la urea **BDSU** sin ningún tipo de sustituyente y la **BPSU** con grupos electroaceptores $-\text{COOMe}$ también en las posiciones 10,10' y 13,13'.

Si se comparan los espectros de las ureas **BDSU** (**Figura 54**) y **DSA** (**Figura 51**), su amina precursora, se puede observar que la formación de la urea disminuye significativamente el carácter electrodador de la anilina y los espectros, valores de rendimiento cuántico y tiempo de vida de fluorescencia de la **BDSU** se asemejan mucho más a los del diestirilo **DSB** (**Figura 48** y **Tabla 4**).

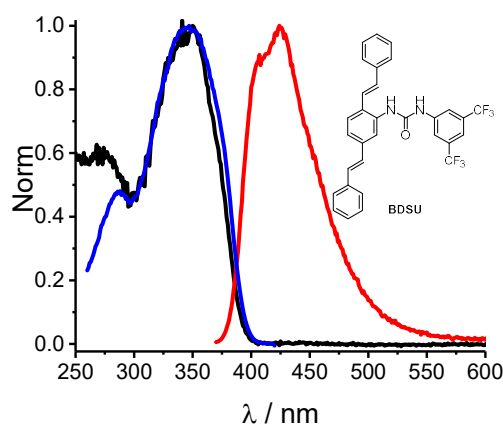


Figura 54. Espectros normalizados de la urea BDSU bloque precursor de CLPs en ACN. En negro, espectro de absorción; en azul, el de excitación λ_{em} 475 nm y, en rojo, el de emisión λ_{exc} 350 nm.

Al igual que ocurre con los derivados de anilina fluorescentes, la adición de los grupos electroaceptores en la urea **BPSU** (**Figura 55b**) afecta en mayor grado la estructura electrónica que en el caso de la molécula **BMSU** con grupos –OMe dadores de carga (**Figura 55a**). De nuevo, el proceso de transferencia de carga ICT que se esquematiza en la **Figura 56**, se ve favorecido con la adición de los grupos éster, produciendo un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión a 484 nm. Respecto a la urea **BDSU** ($\lambda_{\text{EM}} = 424 \text{ nm}$) también se produce una disminución significativa del rendimiento cuántico de fluorescencia (0.081). Aun así, el Φ_f es 10 veces superior al de la anilina **DPA** y suficiente para proporcionar una buena señal fluorescente. El tiempo de vida de fluorescencia para **BPSU** es similar al de su análogo con el grupo anilina **DPA** (0.85 ns), aunque en este caso τ_f es monoexponencial y no presenta el componente largo de 3.35 ns observado para la **DPA**.

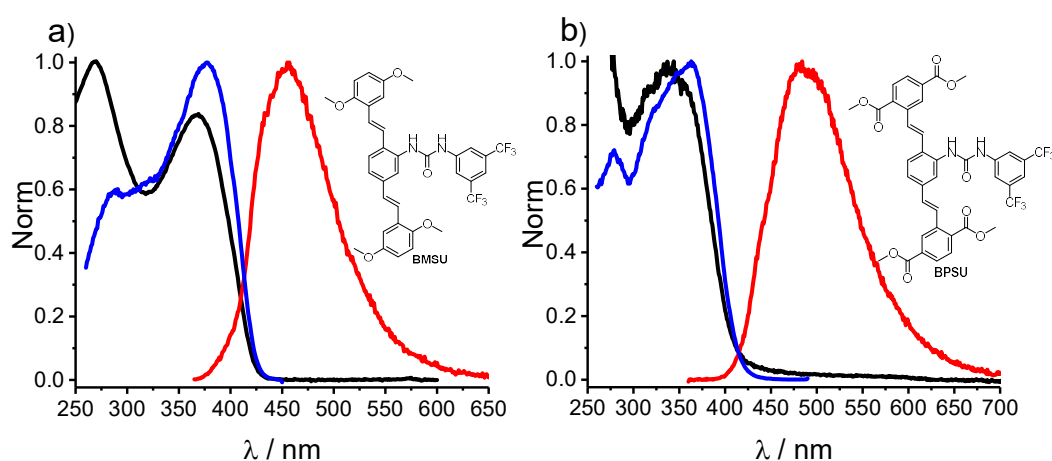


Figura 55. Espectros normalizados de diferentes elementos precursores urea BMSU y BPSU de CLPs en ACN. En negro, el espectro de absorción; en azul, el de excitación y, en rojo, el de emisión: a) BMSU: λ_{exc} 355 nm, λ_{em} 455 nm; b) BPSU: λ_{exc} 355 nm, λ_{em} 500 nm.

La **Tabla 4** presenta un resumen de las propiedades espectroscópicas de los diferentes elementos precursores de CLPs y la **Figura 56** representa el mecanismo propuesto de transferencia intramolecular de carga fotoinducida que puede tener lugar tras la excitación de los distintos fluoróforos tipo anilina o urea y su modulación en función del carácter electrodonador de los sustituyentes en posición 10,10' y 13,13'.

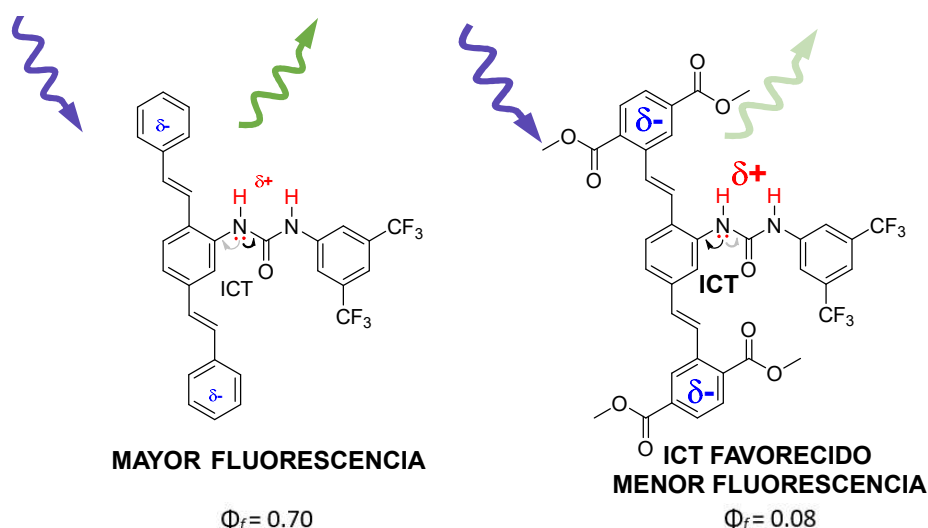


Figura 56. Representación esquemática de cómo se ve favorecido el ICT debido a los sustituyentes electroaceptores, lo que produce una disminución de la fluorescencia.

Tabla 4. Datos espectroscópicos de los elementos precursores de CLPs disueltos en acetonitrilo a (25 ± 1) °C equilibrado al aire.

	$\lambda_{\text{ABS}}^{\text{Max}}$ (nm)	$\epsilon \times 10^4$ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹) ^a	$\lambda_{\text{EM}}^{\text{Max}}$ (nm)	Φ_f^b	τ_f (ns) ^c
DSB	349	7.0	389; 408	0.70 ± 0.04	1.42
DMA	325; 388	3.3; 5.3	488	0.46 ± 0.04	2.70
DSA	326; 375	2.5; 1.9	478	0.44 ± 0.04	3.02
DPA	327; 390	24.8; 19.6	515	$9.3 \pm 0.1 \cdot 10^{-4}^d$	3.35 (7 %) 0.86 (93 %)
BMSU	267; 367	2.8; 2.3	455	0.54 ± 0.04	2.06
BDSU	349	4.8	424	0.66 ± 0.04	1.54
BPSU	350	2.0	484	0.08 ± 0.04	0.85

^a Incertidumbre estimada de los máximos de longitud de onda ± 1 nm, y de los coeficientes de absorción molar (ϵ) ± 10 %. ^b Rendimientos cuánticos de fluorescencia medidos usando sulfato de quinina en HClO₄ 0.1 M como estándar ($\Phi_f = 0.60 \pm 0.04$).⁹⁰ ^c Tiempos de vida de fluorescencia (λ_{exc} 380 nm) λ_{em} : DSB 415 nm, DSA 475 nm, DMA 480 nm, DPA 520 nm, BDSU 425 nm, BMSU 455 nm, BPSU 480 nm. Para todos, la curva de extinción se ajustó a una función monoexponencial, a excepción del DPA, para el que el ajuste fue biexponencial y cuya contribución de cada τ_f se muestra entre paréntesis en la misma tabla. ^d El valor es más pequeño que la propia incertidumbre introducida por el error del estándar de fluorescencia, así se ha proporcionado como error la desviación de las diferentes medidas.

Una vez caracterizados los diferentes elementos precursores de CLPs basados en ureas fluorescentes (**BMSU**, **BDSU** y **BPSU**), se procedió a valorar su respuesta frente a los diferentes aniones. En primer lugar, se valoró la interacción con acetato (**Figura 57**), como el modelo más simple de anión carboxilato. En este caso, a diferencia de las aminas en las que solo respondió la más ácida (**DPA**, **Figura 53**), se observó respuesta tanto de la urea homóloga **BPSU** como de **BDSU** (**Figuras 57c** y **57b**), respectivamente. La única urea que no respondió a la presencia de acetato fue la **BMSU** (**Figura 57a**). La que mayor respuesta presentó fue la molécula con los

sustituyentes electroaceptores **BPSU**, cuyo efecto se manifiesta aumentando la acidez de los hidrógenos NH de la urea. Este hecho también explica por qué la urea **BMSU** no responde al anión acetato. Los grupos metóxido, ricos en electrones, hacen que esta urea sea mucho menos ácida y precise de un ion mucho más básico para una interacción eficaz.

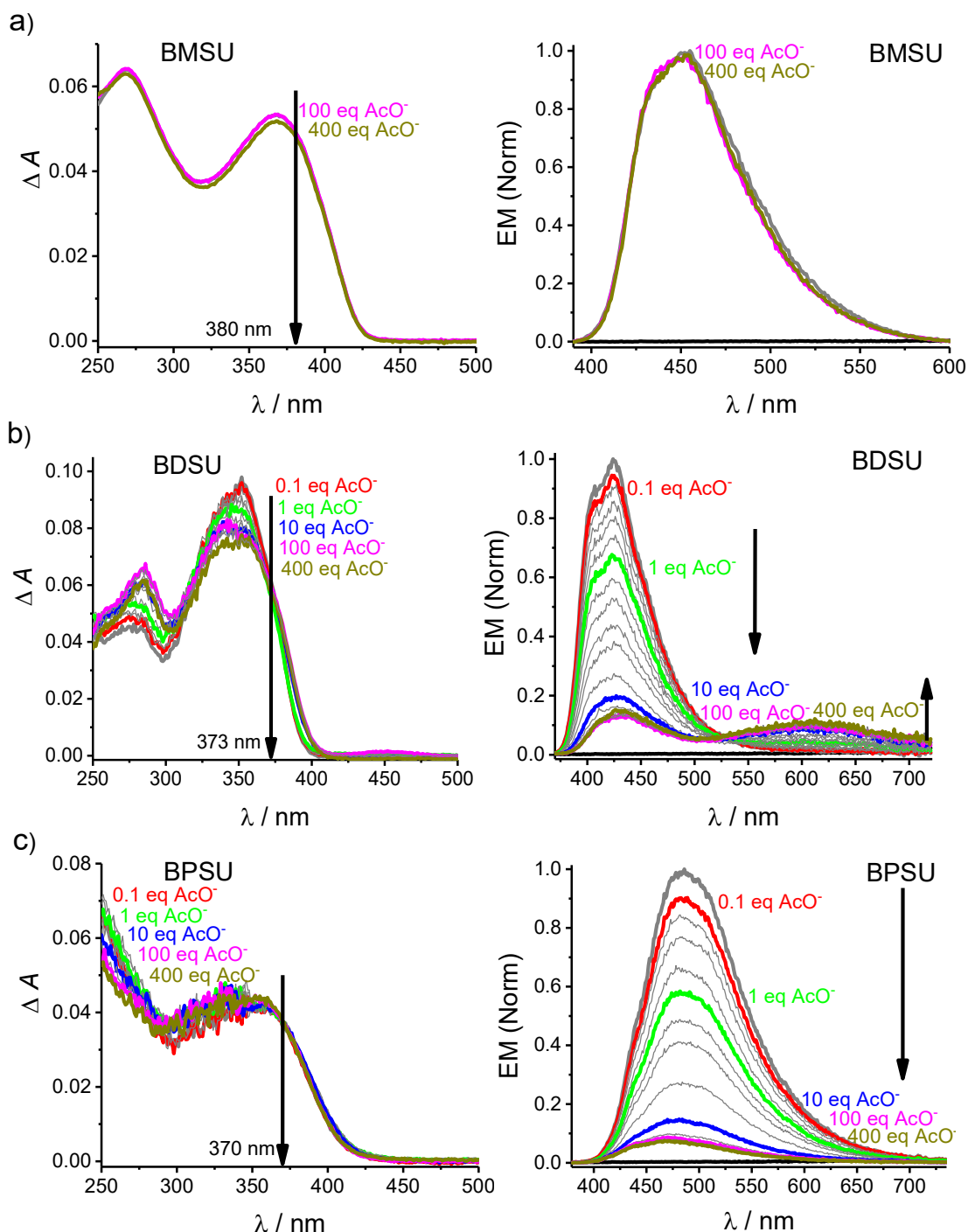
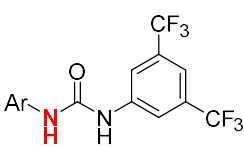


Figura 57. Variación de la señal óptica de absorción (izquierda) y emisión (derecha) de las ureas fluorescentes a) BMSU (1.8×10^{-6} M, $\lambda_{\text{exc}} = 380$ nm) b) BDSU (1.8×10^{-6} M, $\lambda_{\text{exc}} = 373$ nm) y c) BPSU (2.0×10^{-6} M, $\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm) frente a la adición de cantidades crecientes del ion acetato en ACN.

El aumento de la acidez en función del carácter electroatractor de los sustituyentes también se ve reflejada en los valores de los desplazamientos químicos del -NH de la urea obtenidos por ^1H -RMN de DMSO-d_6 . A mayor carácter electroatractor de los sustituyentes, más desapantallado se encuentra el NH, lo que se refleja en un aumento de los valores de δ ; así, cuanto más ácido es el protón, más desapantallado aparece (**Tabla 5**).

Tabla 5. Comparación del valor del desplazamiento químico obtenido por ^1H -RMN de DMSO-d_6 en función de la fuerza electroaceptora de los sustituyentes.



FUERZA e^- ACEPTORA	$\text{CO}_2\text{Me} > \text{H} > \text{OMe}$
$\delta_{\text{(R)}}$ (ppm)	8.77 > 8.66 > 8.61
ACIDEZ	$\text{CO}_2\text{Me} > \text{H} > \text{OMe}$

Como se observa en su espectro de emisión, la urea **BDSU** (**Figura 57b**) muestra un comportamiento algo diferente al de la urea **BPSU**. Mientras que en el caso de **BPSU** la adición del ion acetato solo produce una disminución de la intensidad de fluorescencia, en el caso de **BDSU** esta disminución viene acompañada de la aparición de una nueva banda ancha y desestructurada a 625 nm. Esta banda comienza a observarse a partir de 0.1 equivalentes de acetato ($0.2 \times 10^{-6} \text{ M}$) y se aprecia claramente con la adición de 1 equivalente ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$). La formación de esta nueva banda se observa mejor en la ampliación de **Figura 58**.

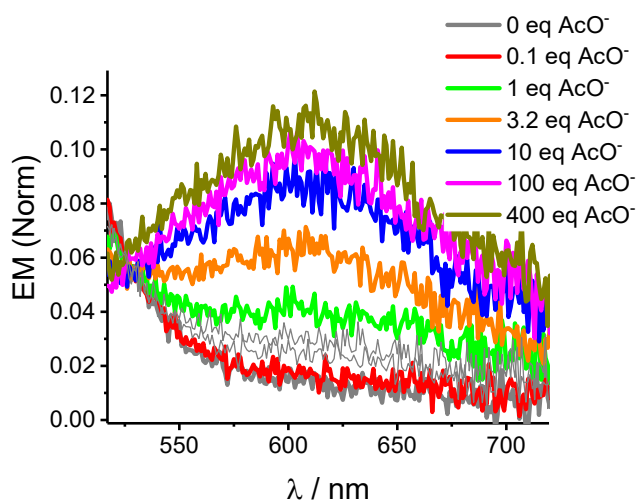


Figura 58. Ampliación del espectro de emisión de BDSU en la zona de 520 – 720 nm frente adiciones crecientes del ion acetato (de 0 a 400 eq).

Así, el proceso de reconocimiento del anión acetato por el ligando fluorescente constaría de dos pasos como se muestra en la **Figura 59**. Un primer paso en el que se produciría la disminución de la luminiscencia del ligando libre a 424 nm, debido a la potenciación del proceso de transferencia intramolecular de carga (ICT), que se ve favorecido cuando la urea interacciona con el ion acetato y un segundo paso responsable de la aparición de la banda a 625 nm atribuible a un proceso de transferencia de protón en el estado excitado (ESPT). Un primer experimento que se hizo para confirmar que la transferencia del protón solo tenía lugar en el estado excitado, fue la comprobación de que el espectro de *excitación* tras la adición de 100 eq de AcO^- recogido a 425 nm, coincidía con el recogido a 620 nm y éstos a su vez coincidían con el espectro de absorción. Estos resultados se muestran en la **Figura 60**. Gracias a los estudios de absorción transitoria con láseres de femtosegundo, que se muestran en el apartado 4.3 de este mismo capítulo, se ha podido conocer más sobre las interacciones receptor-analito.

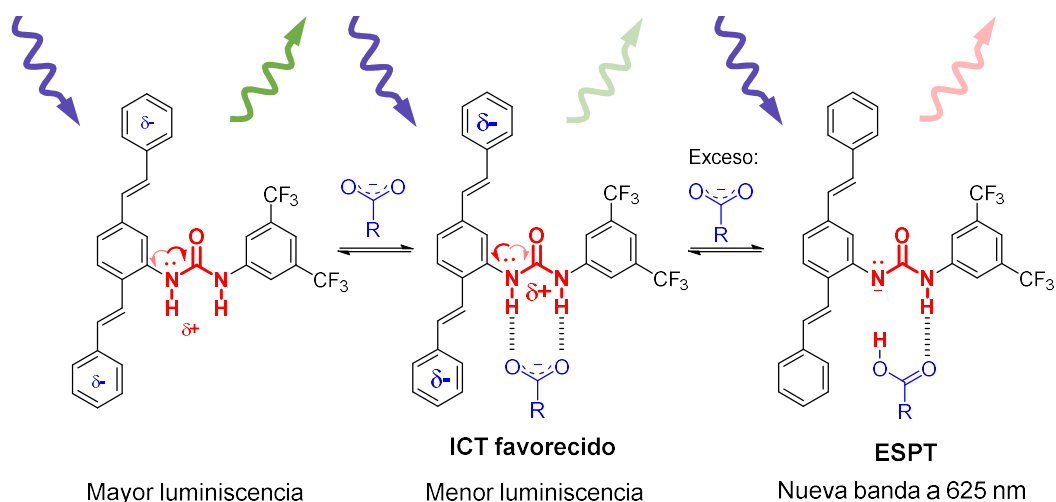


Figura 59. Posible mecanismo de reconocimiento de acetato por BDSU y cambio en la señal luminiscente por la influencia en el proceso de ICT.

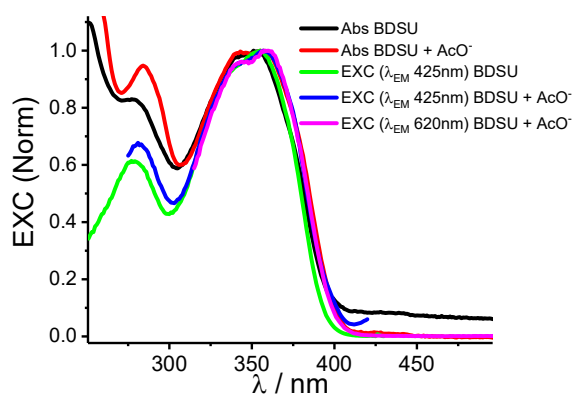


Figura 60. Espectros de absorción y excitación normalizados en ACN para la urea libre BDSU (1.8×10^{-6} M) y tras la adición de 100 equivalentes de acetato. Absorción de BDSU libre en negro y tras la adición del anión en rojo; excitación de BDSU libre (λ_{EM} 425 nm) en verde y tras la adición del anión en azul (λ_{EM} 425 nm) y en rosa (λ_{EM} 620 nm).

Este comportamiento, aunque menos acentuado, también se observa en la valoración de la respuesta de la urea **BDSU** frente al ion fluoruro (**Figura 61b**). La formación de esta nueva banda se emisión a 625 nm, ancha y desestructurada, se atribuye a un proceso de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) tal y como aparece en la **Figura 59**.

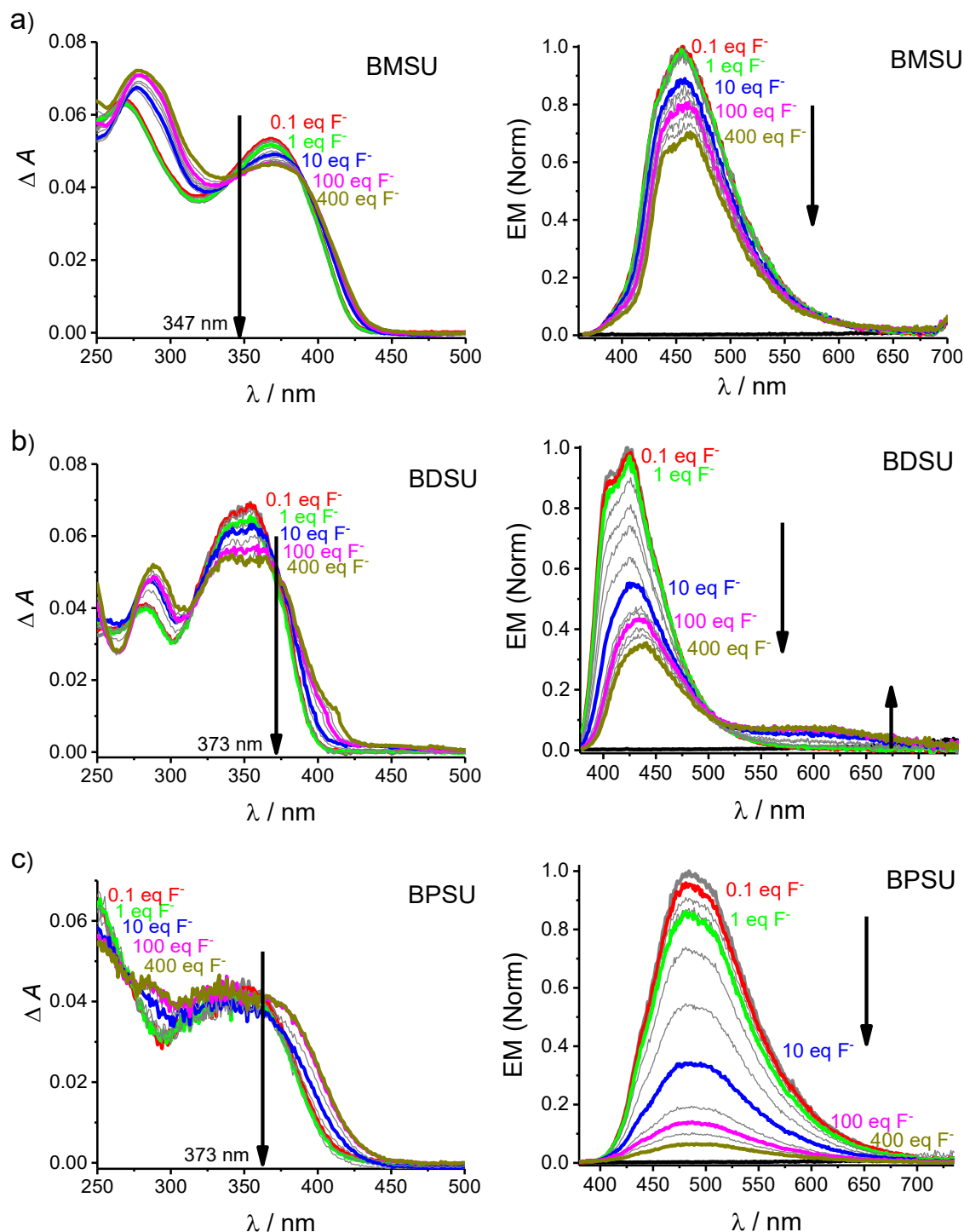


Figura 61. Variación de la señal óptica de absorción (izquierda) y emisión (derecha) de las ureas fluorescentes disueltas en ACN a) BMSU (2.1×10^{-6} M, λ_{exc} 347 nm), b) BDSU (1.8×10^{-6} M, λ_{exc} 373 nm) y c) BPSU (2.0×10^{-6} M, λ_{exc} 370 nm) frente a la adición de cantidades crecientes de fluoruro en ACN (de 0 a 400 eq).

Cuando se llevan a cabo las valoraciones con el anión fluoruro se observa que, en este caso, el derivado con grupos electrodadores –OMe (**BMSU**) sí responde a la presencia de este anión. Aunque, como ya se ha comentado, los grupos metóxido disminuyen la acidez del –NH de urea en **BMSU**, el anión fluoruro es suficientemente básico como para producir dichos cambios. La respuesta de **BDSU** y **BPSU** (Figuras 61b y 61c, respectivamente) va en la misma línea que la que se obtuvo con el anión acetato, es decir, la respuesta del receptor **BDSU**, de acidez superior al suprimir los grupos electrodadores, aumenta y la respuesta de la urea más ácida, la **BPSU**, es la más significativa.

Para poder calcular la constante de interacción receptor-analito se llevaron a cabo, en primer lugar, las representaciones de *Job* correspondientes (Figura 62), y poder determinar así la estequiometría del evento de unión. Con esta información se calculó la constante de interacción haciendo uso del programa informático HypSpec2014, que realiza un ajuste global con los diferentes espectros de emisión. Los valores de las constantes obtenidos se recogen en la **Tabla 6**.

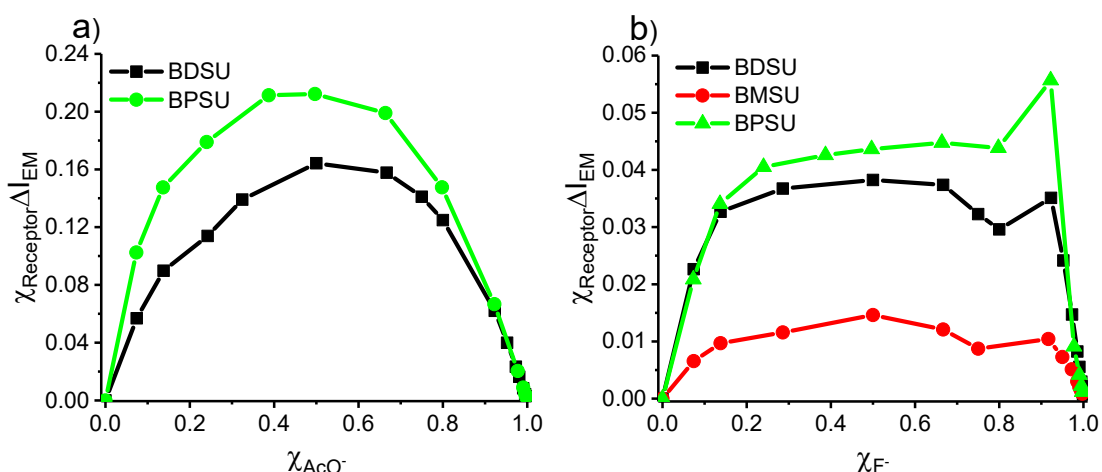


Figura 62. Representación de Job de la interacción a) acetato-receptor b) fluoruro-receptor en ACN. En negro para BDSU, en rojo para BMSU y en verde para BPSU.

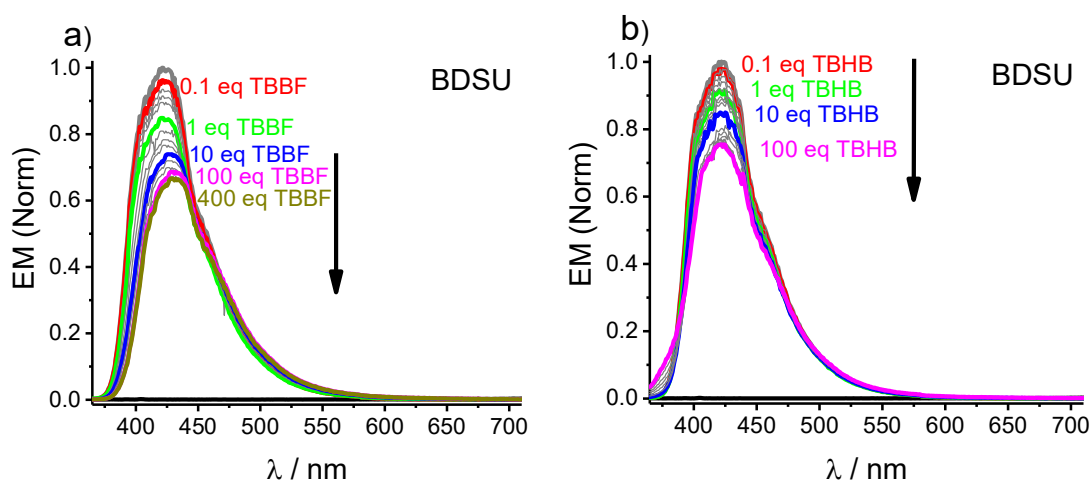
De la **Figura 62a** se deduce claramente que la interacción urea-acetato es 1:1. Para el caso urea-fluoruro (**Figura 62b**) la estequiometría no está tan clara. No se observa claramente una tendencia asintótica sobre $\chi = 0.5$ correspondiente a una interacción 1:1 y además aparece, en todos los casos, un pico sobre $\chi = 0.9$. Este pico a $\chi = 0.9$ se produce cuando existe un gran exceso de analito, situación en la que podemos tener una mezcla de especies (formación de complejo, desprotonación parcial o total) que impide la determinación de la constante de interacción urea-fluoruro.

Además del ion acetato, como modelo simplificado del anión carboxilato, se emplearon otras dos moléculas carboxiladas como análogos de micotoxinas. Así, se utilizó la sal de

The image displays four chemical structures of mycotoxins, arranged in a 2x2 grid. Each structure is accompanied by its name and a reference to its parent compound in parentheses.

- Ocratoxina A** (análogo de OTA): A complex polycyclic structure featuring a benzene ring, a carboxylate group, and a fused ring system with a chlorine atom and a hydroxyl group.
- TBBF** (análogo de OTA): A structure similar to Ocratoxina A, but with a different side chain and a carboxylate group.
- Citrinina** (análogo de CT): A structure with a central benzene ring, a carboxylate group, and a fused ring system with a hydroxyl group.
- TBHB** (análogo de CT): A structure with a central benzene ring, a carboxylate group, and a fused ring system with a hydroxyl group.

Se llevó a cabo un estudio similar al anteriormente descrito para el ion acetato y el ion fluoruro. Las sondas moleculares se disolvieron en ACN y se midió el espectro de absorción y emisión frente a cantidades creciente tanto de **TBBF** como de **TBHB** (**Figuras 64 y 65**). El espectro de absorción no se ha representado, ya que este prácticamente no variaba. Se decidió emplear las mismas λ_{exc} que para el ion acetato: 370 nm para **BD SU** y 373 nm para **BPSU**. Debido a problemas de solubilidad del **TBHB** en ACN, no se pudieron superar los 100 eq (0.2 mM) durante la valoración de la respuesta de los diferentes receptores frente a esta molécula. Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 64 y 65**.



134

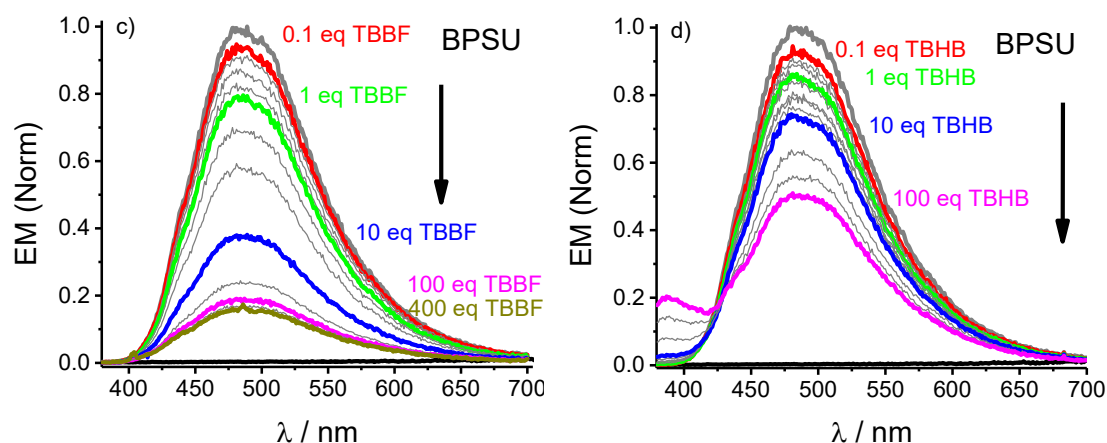


Figura 65. Variación de la emisión de la urea fluorescente BPSU (2.0×10^{-6} M, λ_{exc} 370 nm) frente a la adición de cantidades crecientes de los sucedáneos de micotoxinas a) TBBF (de 0 a 400 eq) y b) TBHB (de 0 a 100 eq).

En las **Figuras 64 y 65** se observa que tanto la urea **BDSU** como la **BPSU** responden a la presencia de ambas moléculas carboxiladas, siendo la sonda molecular **BPSU**, con grupos metoxycarbonil en las posiciones 10,10' y 13,13', la que muestra una respuesta mayor a ambos sucedáneos de micotoxinas. En este caso, la explicación se encuentra en la basicidad de los analitos. El ion acetato, mucho más básico (pK_a 4.76) que el **TBBH** y **TBBF** (valores del pK_a alrededor de 2.5), interacciona de forma muy efectiva con ambas ureas **BDSU** y **BPSU** (**Figura 57**). Cuando la basicidad del analito disminuye, únicamente el receptor urea **BPSU**, más ácido, es capaz de proporcionar una respuesta importante. Para la determinación de las constantes de interacción receptor-analito, de nuevo se determinó la estequiometría mediante valoraciones por el método de *Job* obteniendo un valor de 1:1 en todas las combinaciones analizadas (**Figura 66**). Con ayuda del programa HypSpec2014 se calcularon las constantes de unión. En la **Tabla 6** se resumen los valores obtenidos.

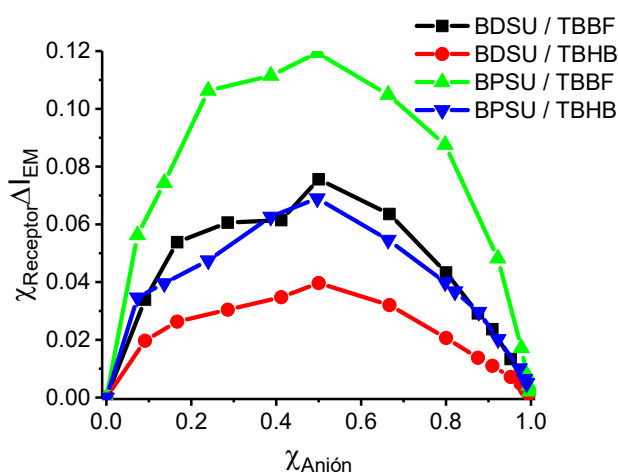



Figura 66. Representación de Job de la interacción ureas-anión.



$\log K$


$X = \text{CH}_3\text{O}$


$X = \text{H}$

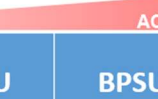
$X = \text{CO}_2\text{CH}_3$

	ACIDEZ			UREA
	BMSU	BDSU	BPSU	
TBHB	~ 0	2.73	3.50	BASICIDAD
TBBF	~ 0	3.18	4.63	
AcO^-	~ 0	5.21	5.64	

* Sales de tetrabutil amonio.







4.3. Caracterización por fluorescencia resuelta en el tiempo

Los receptores basados en ureas son de los más empleados en el reconocimiento molecular de oxoaniones.³ Así, la interacción entre ambos ha sido estudiada extensamente empleando diferentes técnicas como RMN,⁹⁷ voltamperometría,⁹⁸ UV-Vis^{43,99-100} y fluorescencia.^{43,99-100} Dentro de este último grupo se incluirían las sondas moleculares (aquí nombrados elementos precursores de CLPs) sintetizadas en la presente tesis. Además de las aquí nombradas, en bibliografía existe una gran variedad de sondas moleculares sintetizadas (**Figura 67**), con las que se han llevado estudios de lo más diverso, como pueden ser la influencia del disolvente tanto en el reconocimiento molecular como en la formación de un ESPT, la influencia de la coordinación carboxilato-urea en la isomerización *cis-trans* o la distinción de la respuesta entre oxoaniones y aniones de geometría inespecífica.

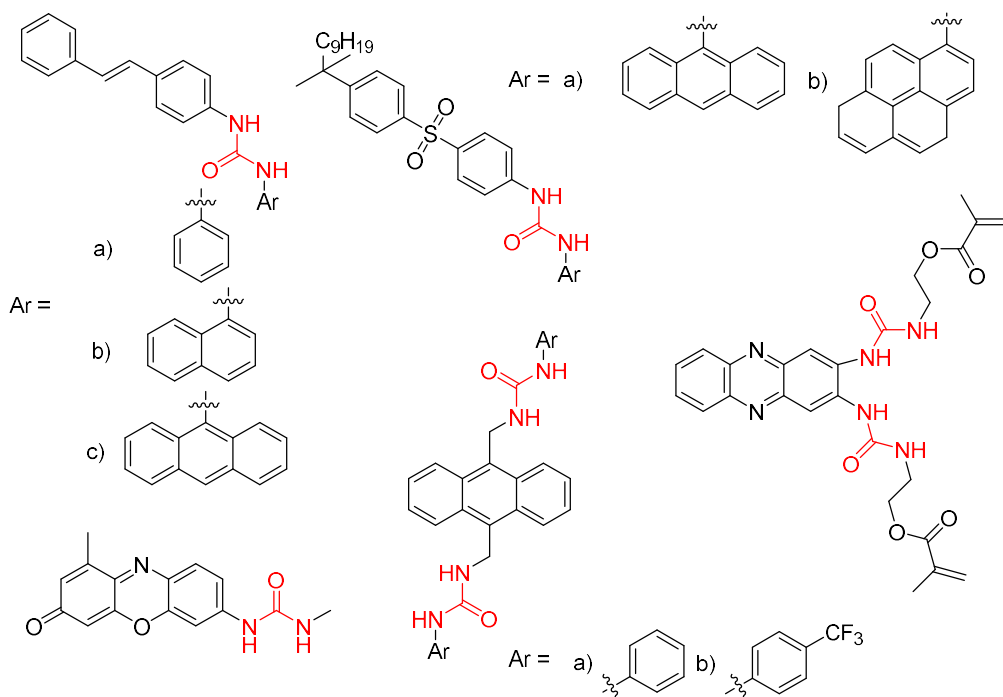


Figura 67. Diferentes ureas fluorescentes empleadas como sondas moleculares en diferentes estudios descritos en bibliografía.^{32,43,99-100}

Pese a esto, poco se sabe de acerca de la secuencia de eventos que ocurren inmediatamente después de la formación del estado excitado electrónico en los aductos urea-carboxilato fluorescentes. Recientemente, el grupo del Prof. Arai ha publicado algunos artículos interesantes sobre el mecanismo de fluorescencia implicado en la señalización de la interacción urea-acetato.⁹⁹⁻¹⁰⁰ En un primer trabajo realizan un exhaustivo estudio, empleando técnicas de espectroscopía absorción, fluorescencia y de ¹H-RMN, sobre el efecto que ejerce el disolvente (DMSO, ACN, THF y tolueno) sobre la reacción ESPT entre diferentes ureas en presencia del acetato de tetrabutilamonio.⁹⁹ En un trabajo posterior, estudian la influencia que tiene la

incorporación del ion fluoruro en el proceso de fotoisomerización *cis-trans* en un conjugado estilbena-urea.¹⁰⁰ Aunque ambos estudios son interesantes y aportan información relevante sobre los mecanismos de interacción urea-analito, hasta la fecha no se ha encontrado ningún artículo que haga uso de técnicas espectroscópicas ultrarrápidas para estudiar el reconocimiento molecular de carboxilatos con sondas moleculares fluorescentes basadas en receptores urea. A continuación, se detallan los experimentos llevados a cabo empleando dicha técnica y las conclusiones a las que se ha llegado sobre los procesos que ocurren en el estado excitado de los diferentes elementos precursores de CLPs.

4.3.1. Caracterización espectroscópica resuelta en el tiempo

El espectro de absorción transitoria de la anilina **DSA** (**Figura 68b**) está compuesto básicamente por tres contribuciones: la decoloración del estado fundamental $S_0 \rightarrow S_1$ (DEF, del inglés *ground state bleaching*, GSB), con un pico negativo sobre 400 nm, la emisión estimulada producida en la transición $S_1 \rightarrow S_0$ (EE, del inglés *stimulated emission*, SE), con un máximo a 475 nm, y una banda ancha e intensa correspondiente a la absorción de estado excitado (AEE, del inglés *excited state absorption*, ESA) situada a 575-600 nm. El espectro de absorción transitoria es similar al obtenido experimentalmente para el diestireno **DSB** (**Figura 68a**), reportado en bibliografía,¹⁰¹ con la diferencia de que la transición $S_1 \rightarrow S_n$ en este último está fuertemente desplazada hacia el rojo. La diferencia se debe al carácter fuertemente electrodador del grupo NH_2 , que disminuye considerablemente la energía del estado S_1 .

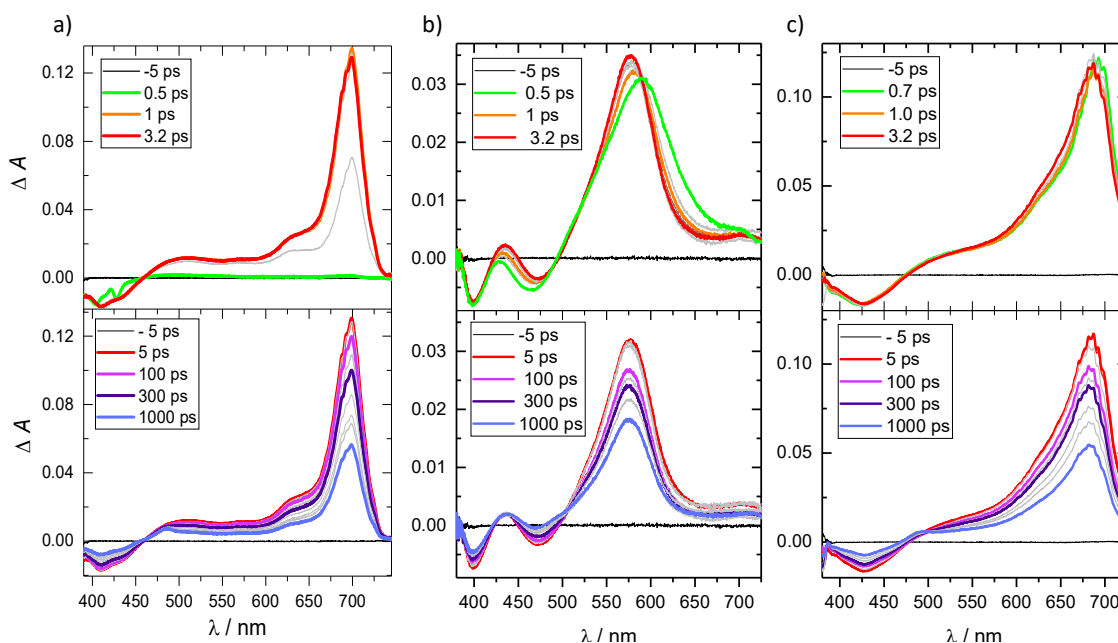


Figura 68. Espectros de absorción transitoria registradas tras la fotoexcitación a 380 nm: a) DSB, b) DSA y c) BDSU en ACN.

A partir del análisis de la evolución temporal de los espectros transitorios, se han podido identificar dos **eventos sucesivos** que transcurren una vez producida la fotoexcitación del **DSA** (**Figura 68b**). El primero se corresponde con los espectros transitorios registrados hasta 3.2 ps, y está caracterizado por el rápido desplazamiento al rojo de la banda de EE junto con la disminución de su intensidad, así como por el desplazamiento al azul y estrechamiento de la banda de AEE. Durante esta primera etapa, la amplitud de la banda DEF es constante, por lo que podemos concluir que se está produciendo una *conversión al estado excitado de mínima energía*, desde el estado electrónico excitado inicialmente poblado, en esta escala de tiempo (el observable es, realmente, la relajación vibracional que sigue a dicha conversión interna). La siguiente etapa transcurre desde los 3 ps hasta pasado el primer nanosegundo. Durante este intervalo de tiempo, la posición y forma de los tres picos principales no sufre cambio alguno y solo la amplitud global de la señal decae. Además, se detectan dos puntos isobésticos a 430 nm y 510 nm. Los valores de cambio de absorbancia en la posición de estos puntos isobésticos confirman la formación de una especie de tiempo de vida relativamente más largo. Para un retraso de 1 ns entre el pulso de excitación y el pulso de muestreo, **DSA** aún se encuentra en el estado S_1 (algo más del 50 % de la intensidad inicial), lo que concuerda con el tiempo de vida de fluorescencia del **DSA** 3.0 ns medido directamente por SPT (**Tabla 4**).

Al igual que ocurre con los espectros de absorción en estado estacionario, la urea **BDSU**, en comparación con **DSA**, exhibe una respuesta de absorción transitoria (**Figura 68c**) más similar a la del diestilbeno **DSB** que a la de la anilina. El máximo correspondiente a la transición $S_1 \rightarrow S_n$ se encuentra a 680 nm y solo se detecta un muy débil desplazamiento al azul y un ligero estrechamiento de la AEE durante el primer picosegundo. En la misma escala de tiempo no se está produciendo ninguna variación de la banda EE situada a 425 nm. Después de 5 ps se observa una disminución continua de la amplitud del AEE y de las bandas EE. La cinética de la evolución de los espectros transitorios está en concordancia con los resultados medidos por SPT. De nuevo se observa la presencia de un punto isobéstico a 490 nm cuyo valor positivo indica la formación de una especie absorbente residual con un tiempo de vida en la escala de los ns (1.54 ns, **Tabla 4**).

Los datos de TAS para la anilina **DMA** y la urea **BMSU** se muestran en la **Figura 69**. Cualitativamente presentan características similares a las de **DSB**, **DSA** y **BDSU**. Durante los primeros 5 ps, se observa, tanto para **DMA** como para **BMSU**, el desplazamiento batocrómico de la banda de emisión estimulada, que alcanza máximos alrededor de 490 nm y 460 nm, respectivamente, junto con un desplazamiento al azul, más pronunciado para la anilina **DMA**, de la banda AEE. Desde 5 ps a 1 ns (**Figura 69, inferior**), el TAS decae sin evolución espectral,

como lo demuestra la presencia de dos puntos isosbéticos (alrededor de 425 nm y 525 nm para la **DMA**) que también indican la desactivación del estado excitado de mínima energía (con tiempos de vida de 2.70 ns y 2.06 ns para **DMA** y **DMSU**, respectivamente, **Tabla 4**).

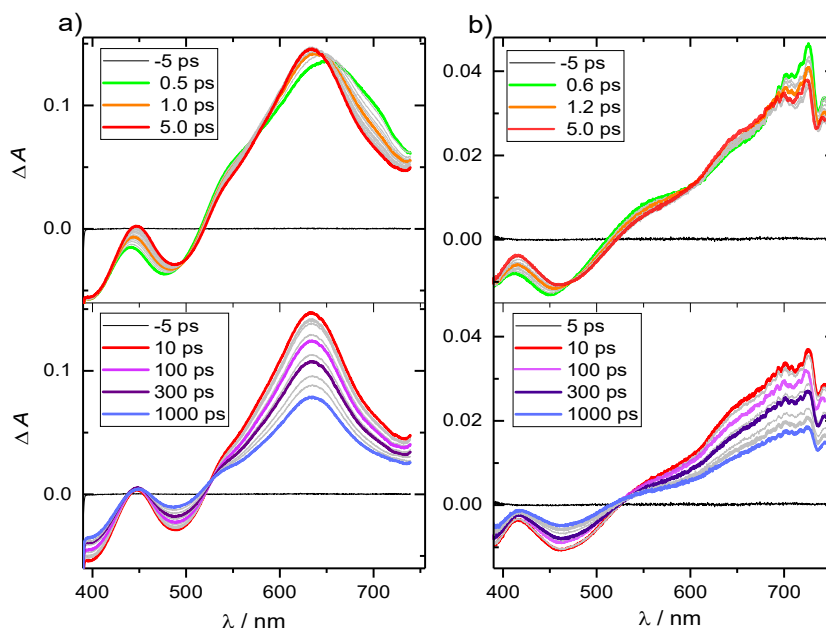


Figura 69. Espectros de absorción transitoria registrados tras la fotoexcitación a 380 nm: a) **DMA** y b) **BMSU** en ACN.

Los espectros de absorción transitoria de **DSA**, **BDSU**, **DMA** y **BMSU** muestran la formación de un estado excitado singlete S_1 tras la excitación a 380 nm, responsable de la fluorescencia de estos compuestos como en el diestilbeno **DSB**. Sin embargo, se observa que la introducción del grupo amino induce una importante perturbación de los estados electrónicos excitados, como se demuestra en los rápidos cambios que sufren las bandas de EE y AEE durante los primeros picosegundos tras la excitación óptica. Comparativamente, estos efectos son menos pronunciados para las ureas **BDSU** y **BMSU**, lo que sugiere que la sustitución en el anillo aromático central del diestilbeno con este grupo no afecta fuertemente a la fotofísica de los derivados del **DSB** contrariamente a lo que ocurre la sustitución por el grupo amino (**DSA**). Esto se observa claramente en los tiempos de vida de fluorescencia de los compuestos, que varían de 1.42 ns (**DSB**) a 3.0 ns y 2.1 ns para **DSA** y **BMSU**, respectivamente (**Tabla 4**). Por lo tanto, a partir de la caracterización espectroscópica del estado estacionario y las medidas de absorción y emisión transitorias, se puede concluir que la fotofísica de las moléculas **DSB** sustituidas con urea se rige por las propiedades de las entidades diestilbénicas y, en particular, para **BDSU** y **BMSU**, la fotoexcitación genera la formación de un estado S_1 emisor cuya vía de desactivación radiante constituye un 66 % y 54 % para **BDSU** y **BMSU**, respectivamente (**Tabla 4**).

Cabe señalar también que la presencia de los grupos metoxilo, electrodonadores, aumenta significativamente el tiempo de vida del estado S_1 pero, a la vez, produce una disminución del rendimiento de conversión al estado fundamental por vía radiante respecto a la urea no sustituida (**BDSU**). Este efecto se entiende bien a partir de la fotorreactividad conocida del *trans*-estilbeno. La ruta reactiva principal del *trans*-estilbeno implica la rotación a lo largo del enlace C=C, para alcanzar el llamado estado excitado “perpendicular” (*perp-st**), desde el cual tiene lugar la conversión interna al estado fundamental (*cis/trans*) y que se caracteriza por poseer una fuerte separación de cargas con cierto carácter radicalario. Por lo tanto, la presencia de grupos –OMe puede, al mismo tiempo, aumentar la vida del estado excitado S_1 , al estabilizar la geometría de transferencia de carga, y disminuir la contribución de la desactivación radiante porque favorece el giro conformacional al estado *perp-st**. No obstante, se necesitan estudios adicionales para aclarar cómo tiene lugar la ruta de desactivación reactiva, así como para identificar el estado de absorción de larga duración responsable de la débil absorción detectada en los datos de TAS, y que se ha atribuido provisionalmente a la formación de un estado triplete resultante de un cruce intersistemas. A continuación, la discusión se centra en las propiedades de emisión del estado S_1 tipo **DSB** en el que se basan las aplicaciones de detección del analito por formación de su aducto con la urea.

4.3.2. Cálculos computacionales

Los cálculos computacionales se llevaron a cabo utilizando diferentes métodos que hacen uso de la teoría del funcional de la densidad (*density functional theory*, DFT) y de la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (*time-dependent density functional theory*, TD-DFT) para determinar la estructura óptima y la función de onda electrónica del estado fundamental S_0 y del estado excitado S_1 más bajo en energía de **DSA**, **DMA**, **BDSU** y **BMSU**. Las estructuras correspondientes resultantes del cálculo computacional se presentan en la **Figura 70**. La geometría del estado fundamental de **BDSU** y **BMSU** exhibe una configuración no plana, resultante de la orientación del grupo urea que se encuentra perpendicular y fuera del plano del esqueleto de diestilbeno. Para **DSA** y **DMA**, sin embargo, el grupo amino es, obviamente, coplanar con el arilo central, pero también se observa una cierta falta de planaridad global de las moléculas debido a las torsiones alrededor del enlace simple C-C que conecta los restos arilo con los C=C de los fragmentos estilbénicos. Naturalmente, la cadena etilénica C=C-C-C es plana para todas las moléculas. Los ángulos diedros que involucran el enlace C=C se resumen en la **Tabla 7**. Avanzando desde la estructura de S_0 a la de S_1 , se observa la progresiva planarización de la parte **DSB** de la molécula, con los valores finales de todos los ángulos diedros etilénicos cercanos a cero.

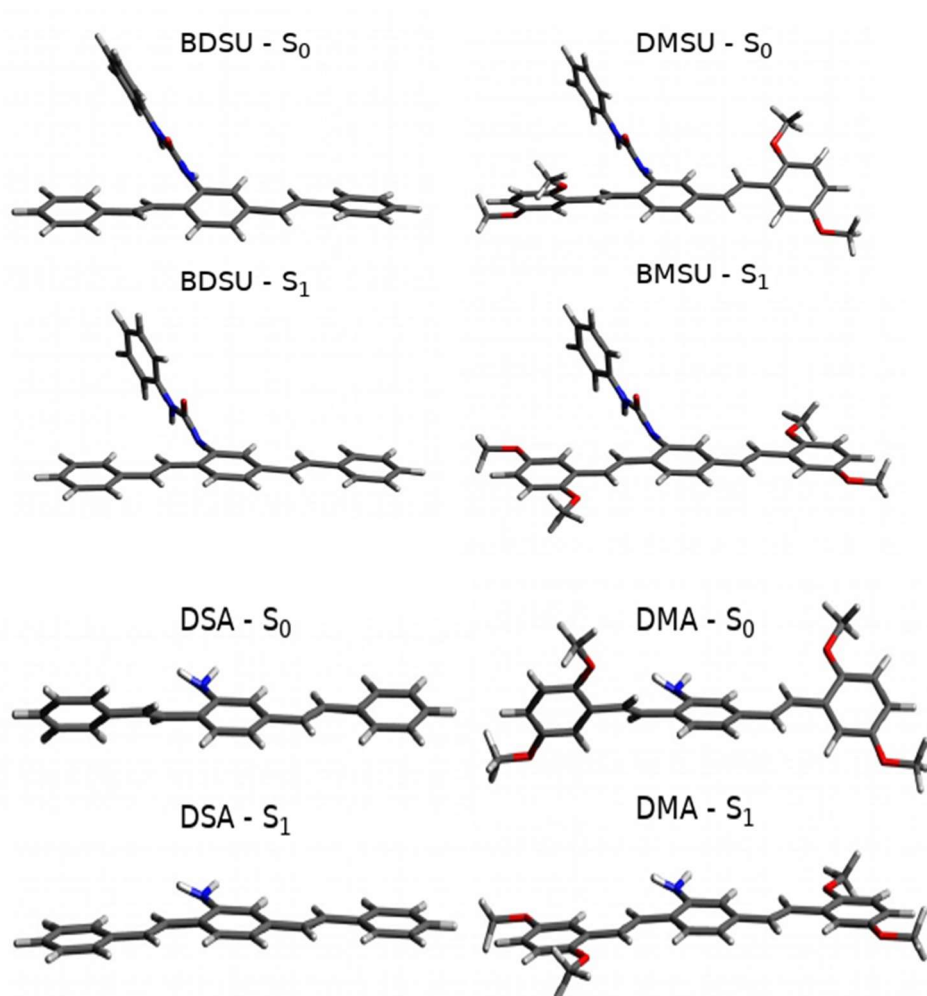


Figura 70. Estructuras optimizadas por TD-DFT del estado fundamental S_0 en el suelo y del estado excitado S_1 singlete de menor energía de las moléculas BDSU, BMSU, DSA y DMA.

Tabla 7. Ángulos diedros alrededor del enlace $C = C$ calculados para el estado fundamental optimizado y para la geometría del estado excitado de menor energía de DSA, BDSU, DMA y BMSU.

	$C_{ar}-C_{ar}-C=C$	$C_{ar}-C=C-C_{ar}$	$C=C-C_{ar}-C_{ar}$	Estilbeno 1 (suma) ^{a)}	$C_{ar}-C_{ar}-C=C$	$C_{ar}-C=C-C_{ar}$	$C=C-C_{ar}-C_{ar}$	Estilbeno 2 (suma) ^{a)}
DSA								
S_0	13.7	2.4	32.6	48.7	-0.6	0.0	4.7	4.1
S_1	0.7	0.8	1.8	3.3	-1.2	-0.1	-0.5	-1.8
DMA								
S_0	26.9	3.6	33.2	63.7	10.8	0.9	25.2	36.9
S_1	0.8	1.0	2.0	3.8	-1.7	-0.3	-2.0	-4.0
BDSU								
S_0	-13.7	0.0	23.5	9.8	-10.2	-0.1	-10.4	-20.7
S_1	-1.1	-0.5	-0.2	-1.8	-0.5	0.1	-0.5	-0.9
BMSU								
S_0	25.5	1.8	23.2	50.5	6.9	0.9	24.2	32.0
S_1	-1.1	-0.9	0.3	-1.7	-1.0	-0.4	-1.0	-2.4

^a Estilbeno 1 y estilbeno 2 hacen referencia, respectivamente, al estilbeno no sustituido y sustituido por el amino o por el grupo urea.

La energía de transición electrónica vertical (transición 0-0) calculada en la geometría del estado fundamental S_0 optimizado se presenta en la **Tabla 8** y está en concordancia con los resultados

obtenidos experimentalmente, en particular con respecto al desplazamiento al rojo de la absorción para los compuestos sustituidos con grupos amino en comparación con los derivados de urea, y también con respecto al desplazamiento al rojo de la absorción observado en los compuestos con grupos metoxilo. Estas transiciones verticales están constituidas por una transición electrónica HOMO-LUMO casi pura. A partir de los cálculos TD-DFT, se determinaron los cambios de la densidad electrónica producidos por la transición desde el estado S_0 al estado S_1 . Estos cambios se muestran en la **Figura 71**. Para los 4 compuestos, las variaciones de densidad electrónica se localizan principalmente alrededor de los enlaces C=C, lo que demuestra que el doble enlace etilénico constituye el cromóforo de la transición y explica la planarización de la estructura al pasar al estado excitado S_1 .

Tabla 8. Energía de transición vertical 0-0, fuerza del oscilador y peso relativo de la transición HOMO-LUMO calculados para la geometría optimizada del estado fundamental de DSA, DMA, BDSU y BMSU.

DSA	DMA
HOMO-LUMO (89 %) (3.57 eV, 347 nm, $f=1.63$)	HOMO-LUMO (84 %) (3.54 eV, 350 nm $f=1.64$)
BDSU	BMSU
HOMO-LUMO (88 %) (3.68 eV, 336 nm $f=1.87$)	HOMO-LUMO (82 %) (3.57 eV, 347 nm, $f=1.79$)

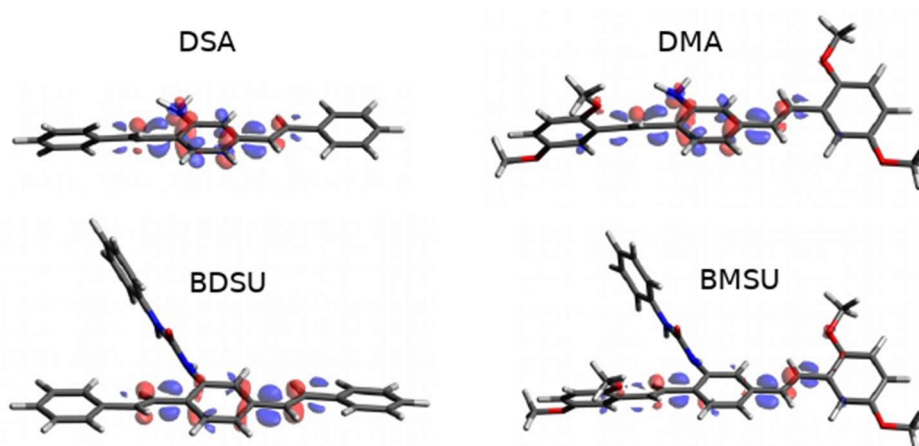


Figura 71. Variación de la densidad electrónica entre el estado S_0 y S_1 calculada para la geometría optimizada del estado fundamental de DSA, DMA, BDSU y BMSU.

Para los aminoderivados, se observa además una perturbación significativa de la densidad electrónica del grupo arilo central que también involucra al grupo $-NH_2$. Esta muestra un carácter de *transferencia de carga* en el estado S_1 que involucra a los electrones del átomo de nitrógeno. Este cálculo está de acuerdo con los cambios ultrarrápidos observados para las bandas ES y AEE de **DSA** y **DMA** en los experimento de TAS (**Figura 68** y **Figura 69**). Por el contrario, los cambios

de la densidad electrónica para los derivados de urea se ubican exclusivamente en los grupos etilénicos, *sin la participación del grupo urea*. Este hallazgo está de acuerdo con las mediciones resueltas en el tiempo con respecto al hecho de que la sustitución por urea no gobierna la naturaleza del estado emisor S_1 de **BDSU** y **BMSU**.

Por lo tanto, a partir de los datos experimentales y los cálculos teóricos, se puede concluir que el estado excitado S_1 formado tras la fotoexcitación de los elementos precursores con grupo urea (**BDSU** y **BMSU**) exhibe las características fotofísicas del bis(estilbeno) no sustituido (**DSB**). La emisión representa más del 55 % de la desactivación del estado excitado de mínima energía al estado fundamental, lo que hace que estos derivados sean prometedores para su aplicación en el campo de los sensores ópticos. A continuación, se describe el efecto de la interacción del ion acetato sobre la eficiencia de la vía de desactivación radiante.

4.3.3. Valoración de la respuesta óptica resuelta en el tiempo de los diferentes elementos precursores a la presencia del ion acetato

Las medidas de absorción transitoria de **BDSU** y **BMSU** en presencia de ión acetato se llevaron a cabo en una disolución de éstos en ACN que contenía 10 eq de AcO^- . Los espectros resultantes se muestran en la **Figura 72**. A esta concentración se espera que todos los derivados de la urea estén unidos por enlaces hidrógeno al ion acetato. La evolución espectral del TAS para el **BDSU** (**Figura 72a y b**) revela, en la escala de tiempo ultracorta (< 5 ps), un desplazamiento hipsocrómico de la banda de absorción S_1-S_n (de 680 nm a 650 nm), junto con un desplazamiento batocrómico de la banda EE a 430 nm. Al mismo tiempo, la banda de absorción AEE a 550 nm aumenta. Esto sugiere una estabilización de la geometría del estado S_1 que no se observa en ausencia de AcO^- . Este proceso se atribuye a la *modificación de la fuerza del enlace de hidrógeno* en el estado excitado de **BDSU**, seguida de la polarización de la distribución de los electrones. Tras los primeros 5 ps, las bandas AEE y EE decaen progresivamente hasta formar una nueva especie caracterizada por una banda de absorción que se extiende desde los 400 a los 600 nm. En relación con esta nueva banda detectada a 600 nm, asignamos la misma a la absorción de la molécula de **BDSU*** *desprotonada*. La cinética a la longitud de onda de 650 nm se representa en la **Figura 71b y d** para **BDSU** y **BDSU-AcO⁻**, respectivamente, ambas en ACN y los valores de los ajustes cinéticos correspondientes se dan en la **Tabla 9**. Se concluyó que, para el **BDSU**, la *transferencia de protón intermolecular* en el estado excitado compite eficientemente con la desactivación radiante del estado S_1 , cuyo tiempo de vida se reduce a menos de 300 ps tras la adición del acetato. Sin embargo, vale la pena señalar que la transferencia de protón intermolecular está lejos de ser un proceso instantáneo.

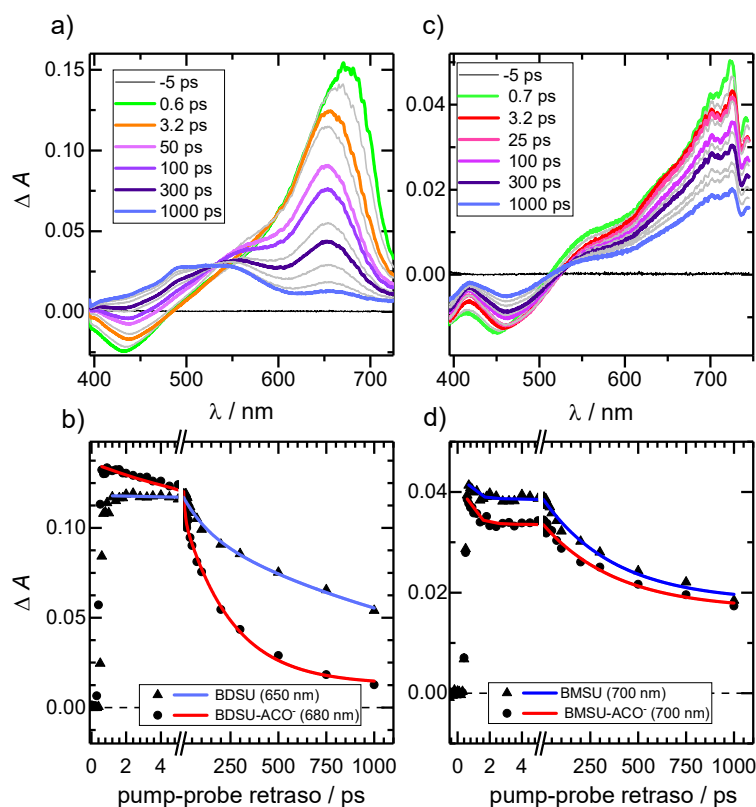


Figura 72. Datos de TAS registrados para los derivados de urea en una disolución de ACN que contiene, respectivamente, 10 eq de acetato (AcO^-) respecto al derivado de urea. a) BDSU (λ_{pump} 380 nm); c) BMSU (λ_{pump} 380 nm). Extinción de la absorción del estado excitado registrado en acetonitrilo puro (▲) y en una disolución de ACN + 10 eq ACO^- (●), y el ajuste correspondiente (ver Tabla 9) para BDSU (b), BMSU (d). La longitud de onda monitorizada se corresponde con el máximo de la absorción del estado excitado a 5 ps y se indica en las gráficas.

Tabla 9. Parámetros de ajuste de la cinética de extinción (primer o pseudo primer orden) de la absorción transitoria (**Figura 72**) de los derivados de urea en acetonitrilo y en acetonitrilo + 10 eq de AcO^- .

ACN	BDSU	BMSU
	$\lambda_{\text{pump}} = 380 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{probe}} = 680 \text{ nm}$ $t_1 = 140 \text{ ps (0.23)}^a$ $t_2 = 1.7 \text{ ns (0.77)}$	$\lambda_{\text{pump}} = 380 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{probe}} = 680 \text{ nm}$ $t_1 = 385 \text{ ps (0.5)}$ $t_2 > 1 \text{ ns (0.5)}$
ACN + 10 eq ACO^-	$\lambda_{\text{pump}} = 380 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{probe}} = 650 \text{ nm}$ $t_1 = 8 \text{ ps (0.23)}$ $t_2 = 255 \text{ ps (0.77)}$	$\lambda_{\text{pump}} = 380 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{probe}} = 650 \text{ nm}$ $t_1 = 375 \text{ ps (0.5)}$ $t_2 > 1 \text{ ns (0.5)}$

^aContribución a la cinética de extinción al realizar un ajuste utilizando un modelo de extinción biexponencial.

Para la molécula **BMSU** se llevó a cabo el mismo experimento (**Figura 72c y d**). Sin embargo, para este compuesto no se produce la desprotonación, por lo que el tiempo vida del estado S_1 no se ve afectado por las interacciones de enlace de hidrógeno. Sin embargo, sí se observa una disminución más pronunciada de la banda AEE a 680 en presencia del anión acetato, que tiene

lugar durante los primeros picosegundos y que refleja una débil respuesta a la interacción a través del enlace de hidrógeno que, sin embargo, no es suficiente para desencadenar la desprotonación.

La desactivación del estado S_1 del derivado de urea puede ocurrir, por lo tanto, a través de tres mecanismos diferentes: (i) por *fluorescencia* desde el estado S_1 similar a **DSB**; (ii) por *isomerización* alrededor de los enlaces C=C, o (iii) por *transferencia de protón*. Los resultados obtenidos muestran que la principal ruta de desactivación del estado S_1 de **BDSU** en presencia de acetato está gobernada por la transferencia de protón en el estado excitado y no por la rotación alrededor de uno de los enlaces C=C de los restos etilénicos. Para **BMSU**, el grupo –OMe, con fuerte carácter electrodonador, estabiliza el conformero enol del grupo urea y la desprotonación no es eficaz. La extinción de la emisión sigue siendo la ruta principal de desactivación del estado S_1 , pero ponemos el énfasis en que, para este compuesto, la fotodinámica del estado excitado es sensible, al menos en el primer picosegundo después de la excitación, a la presencia del enlace de hidrógeno. Es un hecho que la desprotonación es, en muchas situaciones, una situación no deseada porque disminuye el reconocimiento molecular; sin embargo, en este caso, la desprotonación solo tiene lugar en el estado excitado y favorece el aumento de la variación en la señal luminiscente, amplificando la detección del analito.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Kauffman, G. B., Organic building blocks of the chemical industry, *J. Chem. Educ.*, **1990**, 67 (3), A83-A84.
2. Wang, J.; Hou, T., Drug and drug candidate building block analysis, *J. Chem Inf. Model.*, **2010**, 50 (1), 55-67.
3. Gale, P. A.; Howe, E. N. W.; Wu, X., Anion receptor chemistry, *Chem.*, **2016**, 1 (3), 351-422.
4. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/press.html.
(último acceso abril 2019).
5. Lehn, J. M., Supramolecular Chemistry. Concepts and perspectives, *J. Wiley*: USA, **1995**.
6. Anslyn, E. V., Supramolecular Analytical Chemistry, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72 (3), 687-699.
7. Vögtle, F., Dendrimers II: architecture, nanostructure and Supramolecular Chemistry, *Springer*: Germany, **2000**.
8. Ehrlich, P.; Bolduan, C., Collected studies on immunity, *J. Wiley*: USA, **1906**.
9. Fischer, E., Influence of the configuration on the effect of the enzymes, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1894**, 27 (3), 2985-2993.
10. Werner, A., Contribution to the formation of inorganic compounds, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **1893**, 3 (1), 267-330.
11. You, L.; Zha, D.; Anslyn, E. V., Recent advances in Supramolecular Analytical Chemistry using optical sensing, *Chem. Rev.*, **2015**, 115 (15), 7840-7892.
12. Steed, I. P.; Atwood, J. L., *Supramolecular Chemistry* 2ed.; *J. Wiley*: UK, **2009**.
13. Fox, J. D.; Rowan, S. J., Supramolecular polymerizations and main-chain supramolecular polymers, *Macromolecules*, **2009**, 42 (18), 6823-6835.
14. Campbell, N. A.; Reece, J. B.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V.; Jackson, R. B. S. F., *Biology*. 9 ed.; *Pearson Benjamin Cummings*: USA, **2010**.
15. Gale, P. A., Anion receptor chemistry: highlights from 2008 and 2009, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39 (10), 3746-3771.
16. Zheng, B.; Wang, F.; Dong, S.; Huang, F., Supramolecular polymers constructed by crown ether-based molecular recognition, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41 (5), 1621-1636.
17. Jeffrey, G. A., An introduction to hydrogen bonding, *American Chemical Society*: USA, **1998**.
18. Černý, J.; Hobza, P., Non-covalent interactions in biomacromolecules, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2007**, 9 (39), 5291-5303.

19. Matta, C. F.; Castillo, N.; Boyd, R. J., Extended weak bonding interactions in DNA: π -stacking (base–base), base–backbone, and backbone–backbone interactions, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110* (1), 563-578.
20. Hunter, C. A., The role of aromatic interactions in molecular recognition, *Chem. Soc. Revi.*, **1994**, *23* (2), 101-109.
21. Yang, L.; Adam, C.; Nichol, G. S.; Cockroft, S. L., How much do van der Waals dispersion forces contribute to molecular recognition in solution?, *Nat. Chem.*, **2013**, *5*, 1006.
22. Bayly, S. R.; Beer, P. D., Metal-based anion receptor systems. In *Recognition of Anions*, Vilar, R., Ed. *Springer*: Germany, **2008**, 45-94.
23. Kumar Pal, S.; H Zewail, A., Dynamics of water in biological recognition, *Chem. Rev.*, **2004**, *104* (4), 2099-124.
24. Smithrud, D. B.; Sanford, E. M.; Chao, I.; Ferguson, S. B.; Carcanague, D. R.; Evanseck, J. D.; Houk, K. N.; Diederich, F., Solvent effects in molecular recognition, *Pure Appl. Chem.*, **1990**, *62*, 2227.
25. Leslie, M., Strength in numbers?, *Science*, **2014**, *343* (6172), 725.
26. Schneider, H. J., Applications of Supramolecular Chemistry, *CRC Press*: USA, **2012**.
27. Alexander, C.; Davidson, L.; Hayes, W., Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis, *Tetrahedron* **2003**, *59* (12), 2025-2057.
28. Kawakami, K.; Ebara, M.; Izawa, H.; Sanchez-Ballester, N. M.; Hill, J. P.; Ariga, K., Supramolecular approaches for drug development, *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19* (15), 2388-2398.
29. Erbas-Cakmak, S.; Leigh, D. A.; McTernan, C. T.; Nussbaumer, A. L., Artificial molecular machines, *Chem. Rev.*, **2015**, *115* (18), 10081-10206.
30. Ling, X. Y.; Reinhoudt, D.; Huskens, J., From supramolecular chemistry to nanotechnology: assembly of 3D nanostructures, *Pure Appl. Chem.*, 2009, *81* (12), 2225-2233.
31. Urriza-Arsuaga, I.; Bedoya, M.; Orellana, G., Luminescent sensor for O₂ detection in biomethane streams, *Sens. Actuator B-Chem.*, **2019**, *279*, 458-465.
32. Wan, W.; Descalzo, A. B.; Shinde, S.; Weißhoff, H.; Orellana, G.; Sellergren, B.; Rurack, K., Ratiometric fluorescence detection of phosphorylated amino acids through excited-state proton transfer by using molecularly imprinted polymer (MIP) recognition nanolayers, *Chem.-Eur. J.*, **2017**, *23* (63), 15974-15983.
33. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F., Chemical sensors: definitions and classification, *Pure Appl. Chem.*, **1991**, *63* (9), 1247-1250.
34. Wolfbeis, O. S., Chemical sensors — survey and trends, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, *337* (5), 522-527.

35. Catterall, R. W., Chemical Sensors, *Oxford University Press*: UK, **1997**.
36. Janata, J.; Josowicz, M.; Vanýsek, P.; DeVaney, D. M., Chemical sensors, *Anal. Chem.*, **1998**, *70* (12), 179-208.
37. Zourob, M., Recognition receptors in biosensors, *Springer*: USA, **2010**.
38. Anastassopoulou, J.; Theophanides, T., The role of metal ions in biological systems and medicine. In *Bioinorganic Chemistry: an inorganic perspective of life*, Kessissoglou, D. P., Ed. *Springer*: Netherlands, **1995**, 209-218.
39. Essays, UK. (November 2018). The role of metal ions in biochemistry. Retrieved from <https://www.ukessays.com/essays/biology/examining-the-role-of-metal-ions-in-biochemistry-biology-essay.php?vref=1>. (último acceso abril 2019).
40. Weidlich, C.; Mangold, K. M.; Jüttner, K., Conducting polymers as ion-exchangers for water purification, *Electrochim. Acta*, **2001**, *47* (5), 741-745.
41. Sessler, J. L.; Gale, P. A.; Cho, W.-S., Introduction. In *Anion Receptor Chemistry*, Fraser Stoddart, J. F., Ed. *RSC Publishing*: UK, **2006**, 1-26.
42. Chen, Z.-h.; He, Y.-b.; Hu, C.-G.; Huang, X., Preparation of a metal–ligand fluorescent chemosensor and enantioselective recognition of carboxylate anions in aqueous solution, *Tetrahedron-Asymmetry*, **2008**, *19*, 2051-2057.
43. Descalzo, A. B.; Rurack, K.; Weisshoff, H.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M. D.; Amorós, P.; Hoffmann, K.; Soto, J., Rational design of a chromo- and fluorogenic hybrid chemosensor material for the detection of long-chain carboxylates, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127* (1), 184-200.
44. Christianson, D. W.; Lipscomb, W. N., Carboxypeptidase A, *Accounts Chem. Res.*, **1989**, *22* (2), 62-69.
45. Peltomaa, R.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C., Bioinspired recognition elements for mycotoxin sensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, *410* (3), 747-771.
46. Ager, D. J., Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry. In *Process chemistry in the pharmaceutical industry, Volume 2: challenges in an ever changing climate*, Gadamasetti, K.; Braish, T., Eds. *CRC Press Taylor & Francis Group*: USA, **2007**, 157-180.
47. Bowman-James, K.; Bianchi, A.; García-España, E., Anion Coordination Chemistry, *Wiley-VCH Verlag & Co.*: Germany, **2011**.
48. Amendola, V.; Esteban-Gómez, D.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M., What anions do to N–H-containing receptors, *Accounts Chem. Res.*, **2006**, *39* (5), 343-353.
49. Sessler, J. L.; Camiolo, S.; Gale, P. A., Pyrrolic and polypyrrolic anion binding agents. *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, *240* (1), 17-55.

50. Hossain, M. A.; Begum, R. A.; Day, V. W.; Bowman-James, K., Amide and urea-based receptors. In *Supramolecular Chemistry: from molecules to nanomaterial*, Gale, P. A.; Steed, J. W., Eds. John Wiley & Sons, Ltd.: USA, **2012**.
51. Conley, M. P.; Valero, J.; Mendoza, J., Guanidinium-Based Receptors for Oxoanions. In *Supramolecular Chemistry: from molecules to nanomaterial*, Gale, P. A.; Steed, J. W., Eds. John Wiley & Sons, Ltd.: USA, **2012**.
52. El-Ballouli, A. a. O.; Zhang, Y.; Barlow, S.; Marder, S. R.; Al-Sayah, M. H.; Kaafarani, B. R., Fluorescent detection of anions by dibenzophenazine-based sensors, *Tetrahedron Lett.*, **2012**, 53 (6), 661-665.
53. Cui, Y.; Mo, H.-J.; Chen, J.-C.; Niu, Y.-L.; Zhong, Y.-R.; Zheng, K.-C.; Ye, B.-H., Anion-selective interaction and colorimeter by an optical metalloreceptor based on Ruthenium(II) 2,2'-biimidazole: hydrogen bonding and proton transfer, *Inorg. Chem.*, **2007**, 46 (16), 6427-6436.
54. Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Mosca, L., Anion recognition by hydrogen bonding: urea-based receptors, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39 (10), 3889-3915.
55. Smith, P. J.; Reddington, M. V.; Wilcox, C. S., Ion pair binding by a urea in chloroform solution, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33 (41), 6085-6088.
56. Saikia, E.; Borpuzari, M. P.; Chetia, B.; Kar, R., Experimental and theoretical study of urea and thiourea based new colorimetric chemosensor for fluoride and acetate ions, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **2016**, 152, 101-108.
57. Hay, B. P.; Gutowski, M.; Dixon, D. A.; Garza, J.; Vargas, R.; Moyer, B. A., Structural criteria for the rational design of selective ligands: convergent hydrogen bonding sites for the nitrate anion, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126 (25), 7925-7934.
58. Beer, P. D.; Gale, P. A., Anion recognition and sensing: the state of the art and future perspectives, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2001**, 40 (3), 486-516.
59. Gunnlaugsson, T.; Glynn, M.; Tocci, G. M.; Kruger, P. E.; Pfeffer, F. M., Anion recognition and sensing in organic and aqueous media using luminescent and colorimetric sensors, *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250 (23), 3094-3117.
60. Haus, H. A.; Fujimoto, J. G.; Ippen, E. P., Structures for additive pulse mode locking, *J. Opt. Soc. Am. B*, **1991**, 8 (10), 2068-2076.
61. Mark, J.; Liu, L. Y.; Hall, K. L.; Haus, H. A.; Ippen, E. P., Femtosecond pulse generation in a laser with a nonlinear external resonator, *Opt. Lett.*, **1989**, 14 (1), 48-50.
62. Kohler, B.; Yakovlev, V. V.; Che, J.; Krause, J. L.; Messina, M.; Wilson, K. R.; Schwentner, N.; Whitnell, R. M.; Yan, Y., Quantum control of wave packet evolution with tailored femtosecond pulses, *Phys. Rev. Lett.*, **1995**, 74 (17), 3360-3363.

63. Rullière, C., *Femtosecond laser pulses: principles and experiments*, 2 ed., Springer: USA, **2005**.
64. Ruckebusch, C.; Sliwa, M.; Pernot, P.; de Juan, A.; Tauler, R., Comprehensive data analysis of femtosecond transient absorption spectra: a review, *J. Photochem. Photobiol. C-Photochem.*, **2012**, 13 (1), 1-27.
65. Schmitt, M.; Dietzek, B.; Hermann, G.; Popp, J., Femtosecond time-resolved spectroscopy on biological photoreceptor chromophores, *Laser Photon. Rev.*, **2007**, 1 (1), 57-78.
66. Lee, I.; Lee, S., Excited-state dynamics of carotenoids studied by femtosecond transient absorption spectroscopy, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2014**, 35 (3), 851-57.
67. Berera, R.; van Grondelle, R.; Kennis, J. T. M., Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems, *Photosynth. Res.*, **2009**, 101 (2), 105-118.
68. Ohkita, H.; Tamai, Y.; Bente, H.; Ito, S., Transient absorption spectroscopy for polymer solar cells, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **2016**, 22 (1), 100-111.
69. Ohkita, H.; Ito, S., Transient absorption spectroscopy of polymer-based thin-film solar cells, *Polymer*, **2011**, 52 (20), 4397-4417.
70. Stolow, A.; Bragg, A. E.; Neumark, D. M., Femtosecond time-resolved photoelectron spectroscopy, *Chem. Rev.*, **2004**, 104 (4), 1719-1758.
71. Grills, D. C.; Turner, J. J.; George, M. W., Time-resolved infrared spectroscopy. In *Comprehensive Coordination Chemistry II*, McCleverty, J. A.; Meyer, T. J., Eds. Pergamon: UK, **2003**, 91-101.
72. Szmajda, H.; Lakowicz, J. R., Fluorescence lifetime-based sensing and imaging, *Sens. Actuator B-Chem.*, **1995**, 29 (1), 16-24.
73. Vdović, S.; Wang, Y.; Li, B.; Qiu, M.; Wang, X.; Guo, Q.; Xia, A., Excited state dynamics of β -carotene studied by means of transient absorption spectroscopy and multivariate curve resolution alternating least-squares analysis, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, 15 (46), 20026-20036.
74. Kovalenko, S. A.; Dobryakov, A. L.; Ruthmann, J.; Ernsting, N. P., Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing, *Phys. Rev. A*, **1999**, 59 (3), 2369-2384.
75. de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E., Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches, *Chem. Rev.*, **1997**, 97 (5), 1515-1566.
76. Guan, J.; Zhang, P.; Wei, T.-b.; Lin, Q.; Yao, H.; Zhang, Y.-m., A highly selective PET-based chemosensor for instant detecting of Zn^{2+} , *RSC Advances*, **2014**, 4 (67), 35797-35802.

77. Mako, T. L.; Racicot, J. M.; Levine, M., Supramolecular luminescent sensors, *Chem. Rev.*, **2019**, *119* (1), 322-477.
78. Xu, S.; Kim, E. H.; Wei, A.; Negishi, E.-i., Pd- and Ni-catalyzed cross-coupling reactions in the synthesis of organic electronic materials, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **2014**, *15* (4), 044201.
79. Urraca, J. L.; Huertas-Pérez, J. F.; Cazorla, G. A.; Gracia-Mora, J.; García-Campaña, A. M.; Moreno-Bondi, M. C., Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, *408* (11), 3033-3042.
80. Hunt, A. R.; Stewart, S. K.; Whiting, A., Heck versus suzuki palladium catalysed cross-coupling of a vinylboronate ester with aryl halides, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34* (22), 3599-3602.
81. Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D., Palladium-catalyzed cross-coupling reactions in total synthesis, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2005**, *44* (29), 4442-4489.
82. Chen, X.; Engle, K. M.; Wang, D.-H.; Yu, J.-Q., Palladium(II)-catalyzed C-H activation/C-C cross-coupling reactions: versatility and practicality, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2009**, *48* (28), 5094-5115.
83. Li, J.; Kendig, C. E.; Nesterov, E. E., Chemosensory performance of molecularly imprinted fluorescent conjugated polymer materials, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129* (51), 15911-15918.
84. Smith, M. B.; March, J., Addition to carbon-carbon multiple bonds. In *March's Advanced Organic Chemistry*, 6 ed.; Smith, M. B.; March, J., Eds. John Wiley & Sons: USA, **2006**, 999-1250.
85. Ho, H. E.; Asao, N.; Yamamoto, Y.; Jin, T., Carboxylic acid-catalyzed highly efficient and selective hydroboration of alkynes with pinacolborane, *Org. Lett.*, **2014**, *16* (17), 4670-4673.
86. Fleige, M.; Möbus, J.; vom Stein, T.; Glorius, F.; Stephan, D. W., Lewis acid catalysis: catalytic hydroboration of alkynes initiated by Piers' borane, *Chem. Commun.*, **2016**, *52* (72), 10830-10833.
87. Ang, N. W. J.; Buettner, C. S.; Docherty, S.; Bismuto, A.; Carney, J. R.; Docherty, J. H.; Cowley, M. J.; Thomas, S. P., Borane-catalysed hydroboration of alkynes and alkenes, *Synthesis* **2018**, *50* (04), 803-808.
88. Cheng, Y.-J.; Yang, S.-H.; Hsu, C.-S., Synthesis of conjugated polymers for organic solar cell applications, *Chem. Rev.*, **2009**, *109* (11), 5868-5923.
89. Krishna, A.; Lunchev, A. V.; Grimsdale, A. C., Suzuki polycondensation. In *Synthetic methods for conjugated polymer and carbon materials*, Leclerc, M.; Morin, J. F., Eds., Wiley: Germany, **2017**, 59-96.

90. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U., Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples, *Nat. Protoc.*, **2013**, *8*, 1535.
91. López-Martínez, E. I.; Rodríguez-Valdez, L. M.; Flores-Holguín, N.; Márquez-Lucero, A.; Glossman-Mitnik, D., Theoretical study of electronic properties of organic photovoltaic materials, *J. Comput. Chem.*, **2009**, *30* (7), 1027-1037.
92. Mahrt, R.; Yang, J.-p.; Greiner, A.; Bässler, H.; Bradley, D. D. C., Site-selective fluorescence spectroscopy of poly(p-phenylenevinylene)s and oligomeric model compounds, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **1990**, *11* (9), 415-421.
93. Burroughes, J. H.; Bradley, D. D. C.; Brown, A. R.; Marks, R. N.; Mackay, K.; Friend, R. H.; Burns, P. L.; Holmes, A. B., Light-emitting diodes based on conjugated polymers, *Nature*, **1990**, *347* (6293), 539-541.
94. Lim, S.-H.; Bjorklund, T. G.; Bardeen, C. J., Characterization of individual submicron distyrylbenzene aggregates using temperature-dependent picosecond fluorescence and atomic force microscopy, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108* (14), 4289-4295.
95. Karabunarliev, S.; Baumgarten, M.; Bittner, E. R.; Müllen, K., Rigorous Franck–Condon absorption and emission spectra of conjugated oligomers from quantum chemistry, *J. Chem. Phys.*, **2000**, *113* (24), 11372-11381.
96. Gierschner, J.; Mack, H.-G.; Lüer, L.; Oelkrug, D., Fluorescence and absorption spectra of oligophenylenevinylenes: Vibronic coupling, band shapes, and solvatochromism, *J. Chem. Phys.*, **2002**, *116* (19), 8596-8609.
97. Ikedu, S.; Nishimura, Y.; Arai, T., Kinetics of hydrogen bonding between anthracene urea derivatives and anions in the excited state, *J. Phys. Chem. A*, **2011**, *115* (29), 8227-8233.
98. Willener, Y.; JolyChristopher, K. M.; MoodyJames, J.; Tucker, H. R., An exploration of ferrocenyl ureas as enantioselective electrochemical sensors for chiral carboxylate anions, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73* (4), 1225-1233.
99. Matsumoto, H.; Ikedu, S.; Tosaka, T.; Nishimura, Y.; Arai, T., Kinetic analysis of tautomer forms of aromatic-urea compounds with acetate ions: solvent effect of excited state intermolecular proton transfer, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2018**, *17* (5), 561-569.
100. Matsumoto, H.; Masai, H.; Nishimura, Y.; Arai, T., The Switching from cis-to-trans one-way photoisomerization to mutual photoisomerization of a stilbene–urea compound triggered by proton transfer reaction, *Chem. Lett.*, **2018**, *47* (4), 536-539.
102. Oliveira, E. F.; Shi, J.; Lavarda, F. C.; Lüer, L.; Millán-Medina, B.; Gierschner, J., Excited state absorption spectra of dissolved and aggregated distyrylbenzene: a TD-DFT state and vibronic analysis, *J. Chem. Phys.*, **2017**, *147* (3), 034903-1/7.

Capítulo 4: Síntesis y caracterización de polímeros conjugados fluorescentes (CLPs)

1.	OBJETIVOS	157
2.	POLÍMEROS CONJUGADOS LUMINISCENTES	158
2.1.	Síntesis.....	158
2.1.1.	Policondensación de Suzuki-Miyaura.....	162
3.	RESULTADOS	165
3.1.	Síntesis.....	165
3.2.	Síntesis de monómeros	168
3.2.1.	Síntesis de monómeros estructurales.....	168
3.2.2.	Síntesis de monómeros funcionales.....	173
3.2.3.	Síntesis de polímeros conjugados luminiscentes.....	174
3.3.	Caracterización óptica.....	180
3.4.	Valoración de la respuesta óptica de los CLPs a la presencia de diferentes analitos.....	183
4.	BIBLIOGRAFÍA.....	188

1. OBJETIVOS

En el último capítulo se aborda la síntesis y caracterización de diferentes polímeros conjugados luminiscentes (CLPs) para su posible aplicación en el campo de los sensores químicos.

Con este fin se llevará a cabo la síntesis de los monómeros precursores necesarios, que se han clasificado en dos grupos:

- i) **Monómeros funcionales** capaces de reconocer a los analitos de interés y que, al mismo tiempo, se puedan integrar en la estructura del CLP. En el caso de la presente Tesis, estos se basan en *aminas* y *piridinas* para el reconocimiento de especies ácidas, o *ureas* para la interacción con carboxilatos.
- ii) **Monómeros estructurales** sin grupos funcionales para el reconocimiento molecular de los analitos, necesarios para la formación de la estructura polimérica.

Debido a que la síntesis de este tipo de polímeros se realiza, mayoritariamente, por reacciones de acoplamiento carbono-carbono catalizadas por paladio (Suzuki, Heck, Sonogashira, etc.), uno de los monómeros ha de contener un haluro de arilo mientras que otro monómero contendrá, normalmente, un grupo borónico.

Finalmente, para la obtención de los **polímeros**, se emplearán dos técnicas distintas de polimerización conocidas por polimerización *en suspensión* y por *precipitación*. Una vez obtenidos los CLPs, se realizará la **caracterización** óptica (absorción, emisión y excitación) y morfológica (SEM) y se valorará su respuesta frente a diferentes ácidos orgánicos y aniones carboxilato.

2. POLÍMEROS CONJUGADOS LUMINISCENTES

2.1. Síntesis

En las últimas décadas, el desarrollo de polímeros conjugados para su aplicación en el campo de la energía y de la optoelectrónica ha despertado un enorme interés en la comunidad científica. Los continuos avances en dichas tecnologías exigen una mejora permanente de los materiales poliméricos cuyas propiedades se adapten a nuevas necesidades, lo que se traduce en el desarrollo y perfeccionamiento de las estrategias de síntesis.¹ En la **Figura 73** se muestra una selección, a modo de ejemplo, de algunos de los polímeros conjugados (PCs) descritos en bibliografía.¹⁻⁴ Como se puede observar, todos ellos están basados en la repetición de unidades monoméricas aromáticas conjugadas entre sí o a través de dobles o triples enlaces. Una excepción es el poliacetileno el cual, pese a presentar una conductividad muy elevada y de ser uno de los primeros en sintetizarse, no aparece en el listado debido a su baja aplicabilidad. Esto se debe a que este material es difícil de procesar y es inestable en presencia de O₂ y H₂O.²

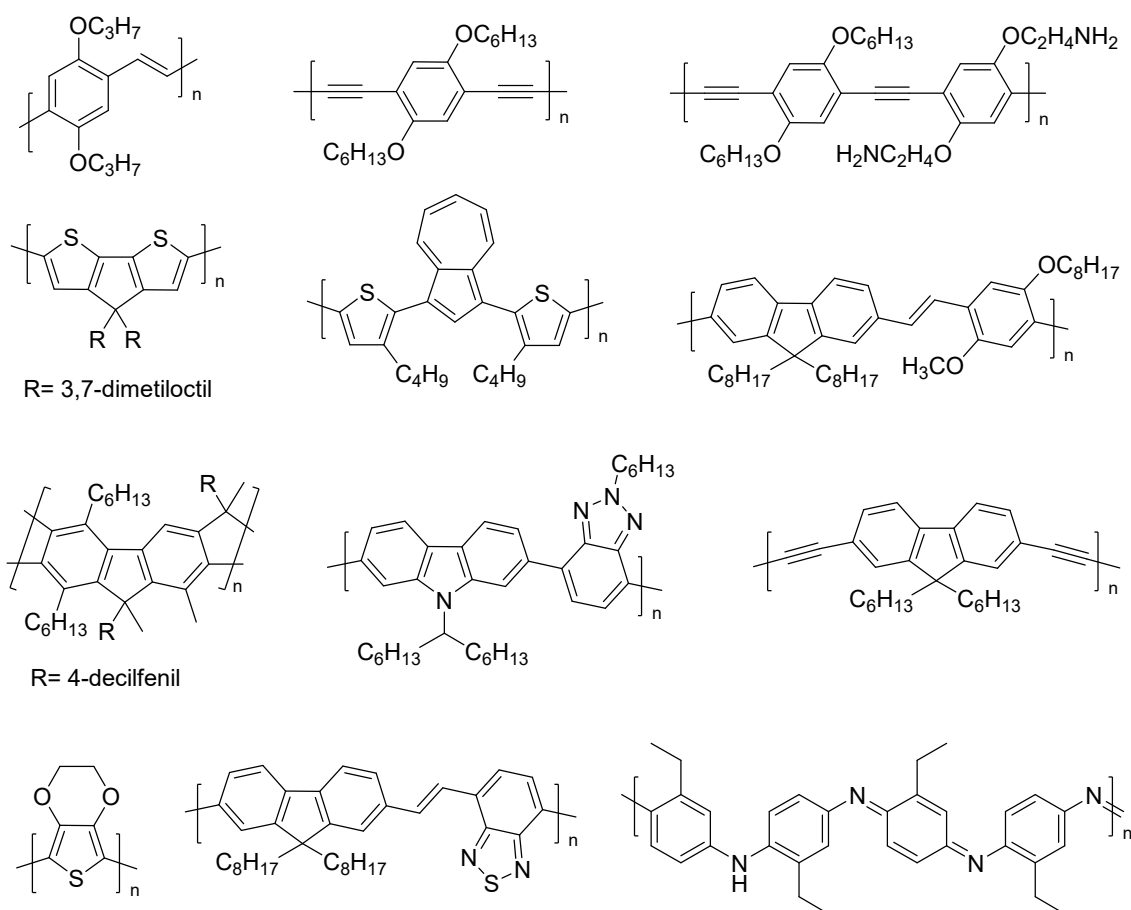


Figura 73. Diferentes estructuras de polímeros conjugados descritas en bibliografía.¹⁻⁴

Pese a la amplia diversidad de PCs que se pueden encontrar en la bibliografía, la mayoría de ellos se basan en la funcionalización y combinación de unas pocas unidades monoméricas; las más utilizadas se presentan en la **Figura 74**:

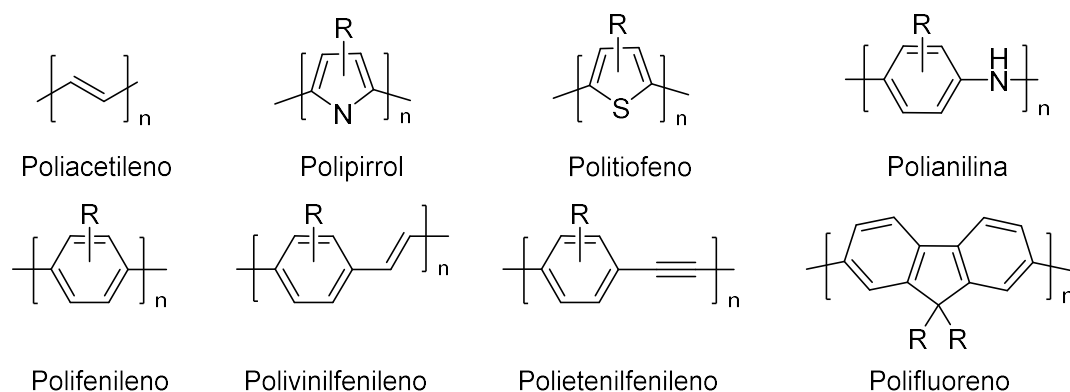


Figura 74. Unidades básicas de repetición de algunos de los polímeros conjugados más comunes.

Para la síntesis de este tipo de materiales existe una gran variedad de reacciones, las cuales podemos dividir en tres grandes grupos:³⁻⁴

- Polimerización **fotoquímica**: muy limitada, se usa típicamente para la polimerización de diacetilenos en forma películas. En ella se produce la polimerización vía dirradicalaria, iniciada al irradiar el monómero diacetileno con una fuente de radiación UV de alta energía, rayos X o rayos γ , seguida de la propagación y reacción del carbeno formado.⁵
- Polimerización **electroquímica**: se emplea sobre todo en la síntesis de politiofenos, polipirroles y polianilinas.⁴ El proceso de estas polimerizaciones se inicia con la oxidación de una unidad monomérica, formando un catión-radical, el cual reacciona con una segunda unidad monomérica antes de que ocurra una posterior desprotonación. El dímero formado se oxida más fácilmente, repitiéndose el proceso descrito anteriormente.² La principal limitación de esta técnica es su aplicabilidad únicamente a monómeros susceptibles de sufrir una oxidación a partir de la aplicación de un voltaje eléctrico.¹
- Polimerización **química**: actualmente es la más empleada debido a la versatilidad que presenta gracias a la cantidad de reacciones que se pueden llevar a cabo. Éstas las podemos clasificar en dos grandes grupos: i) no catalíticas y ii) catalíticas, siendo las más usadas la reacciones de acoplamiento carbono-carbono catalizadas por paladio.²

En la **Figura 75** se muestra un resumen de algunos de los procedimientos de polimerización química que se han empleado en la síntesis de PCs.

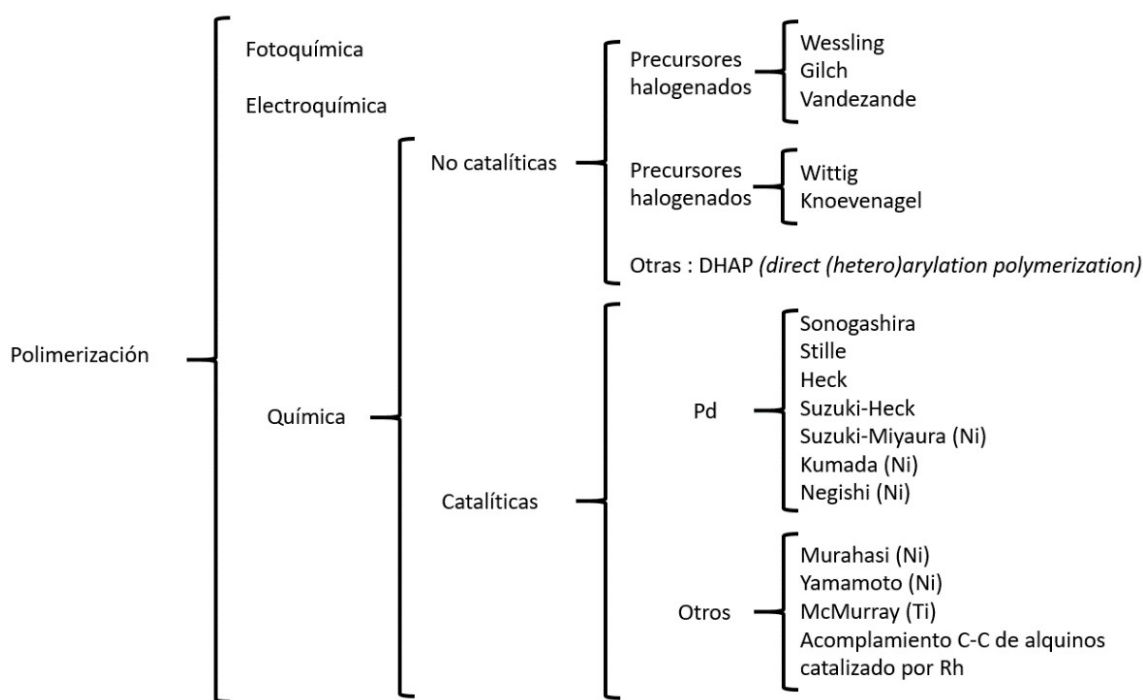


Figura 75. Resumen de las principales metodologías de síntesis química para la obtención de polímeros conjugados (PCs).

De todas las metodologías para la síntesis de estos materiales descritas en la **Figura 75**, las más empleadas son las policondensaciones basadas en reacciones de formación de enlaces C-C catalizadas por metales de transición, especialmente por paladio.⁶ La primera publicación sobre el uso de reacciones de acoplamiento catalizadas por este metal de transición para la obtención de polímeros conjugados es del año 1989. En ella, el grupo de Feast empleó la reacción de Yamamoto para sintetizar una serie de poliparafenilenos con sustituyentes en las posiciones 2 y 4.⁷ Ese mismo año, Bochman utilizó la reacción de Stille para la síntesis de diferentes polímeros aromáticos.⁸ Las principales ventajas de este tipo de reacciones residen en las condiciones suaves de reacción en un único recipiente, además de la compatibilidad con una gran variedad de grupos funcionales, la ausencia general de productos tóxicos generados durante el transcurso de la polimerización y la posibilidad de llevarlas a cabo en presencia de agua.² Generalmente este tipo de reacciones siguen un mismo ciclo característico (**Figura 76**) que consta de tres pasos: i) en primer lugar se produce la *adición oxidativa* del primer monómero, catalizada por el metal de transición a través del carbono unido al electrófilo (C-X); ii) a continuación, se produce la *transmetalación* con el nucleófilo organometálico del segundo monómero para proceder a la etapa final, iii) *eliminación reductora* del catalizador formando el nuevo enlace C-C entre los dos monómeros y reactivando el catalizador para volver a repetir todo el proceso.⁹

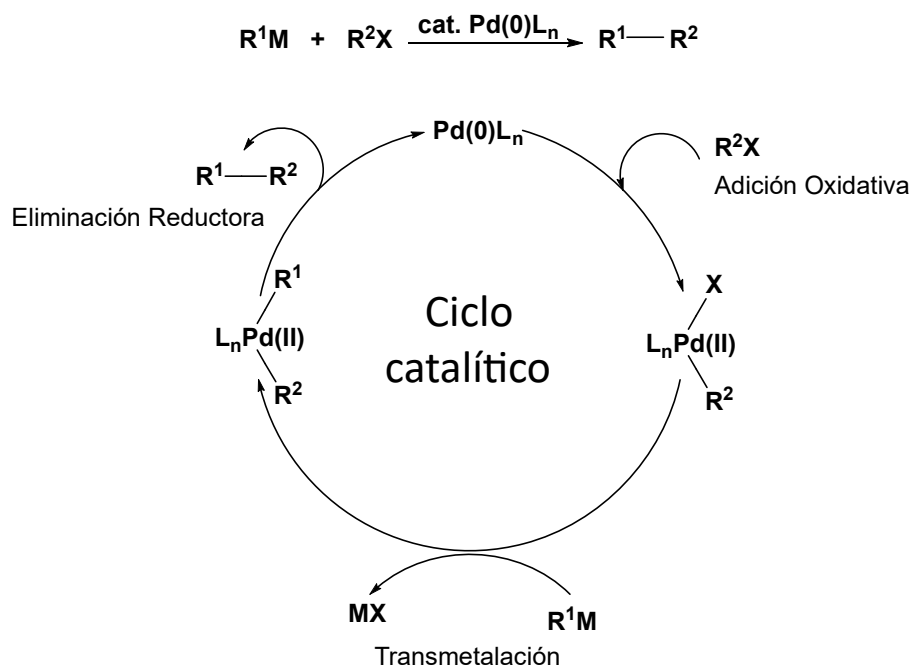


Figura 76. Representación esquemática del ciclo catalítico seguido por las principales reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio.

En general uno de los dos monómeros se encuentra sustituido por un electrófilo que, además, debe de ser un buen grupo saliente como el triflato o los halógenos I y Br. Aunque se obtienen mejores resultados con los derivados de I, los más empleados suelen ser los de Br debido a su mayor accesibilidad y menor coste. Los derivados de Cl, aunque mucho más baratos, no suelen dar buenos resultados, llegando incluso a no tener lugar la reacción.¹⁰ El otro monómero contiene un resto organometálico para lo cual, como se muestra en la **Figura 77**, hay una gran variedad de posibilidades.⁶ En la **Figura 77** se muestran además las reacciones no catalíticas citadas en la **Figura 75**.

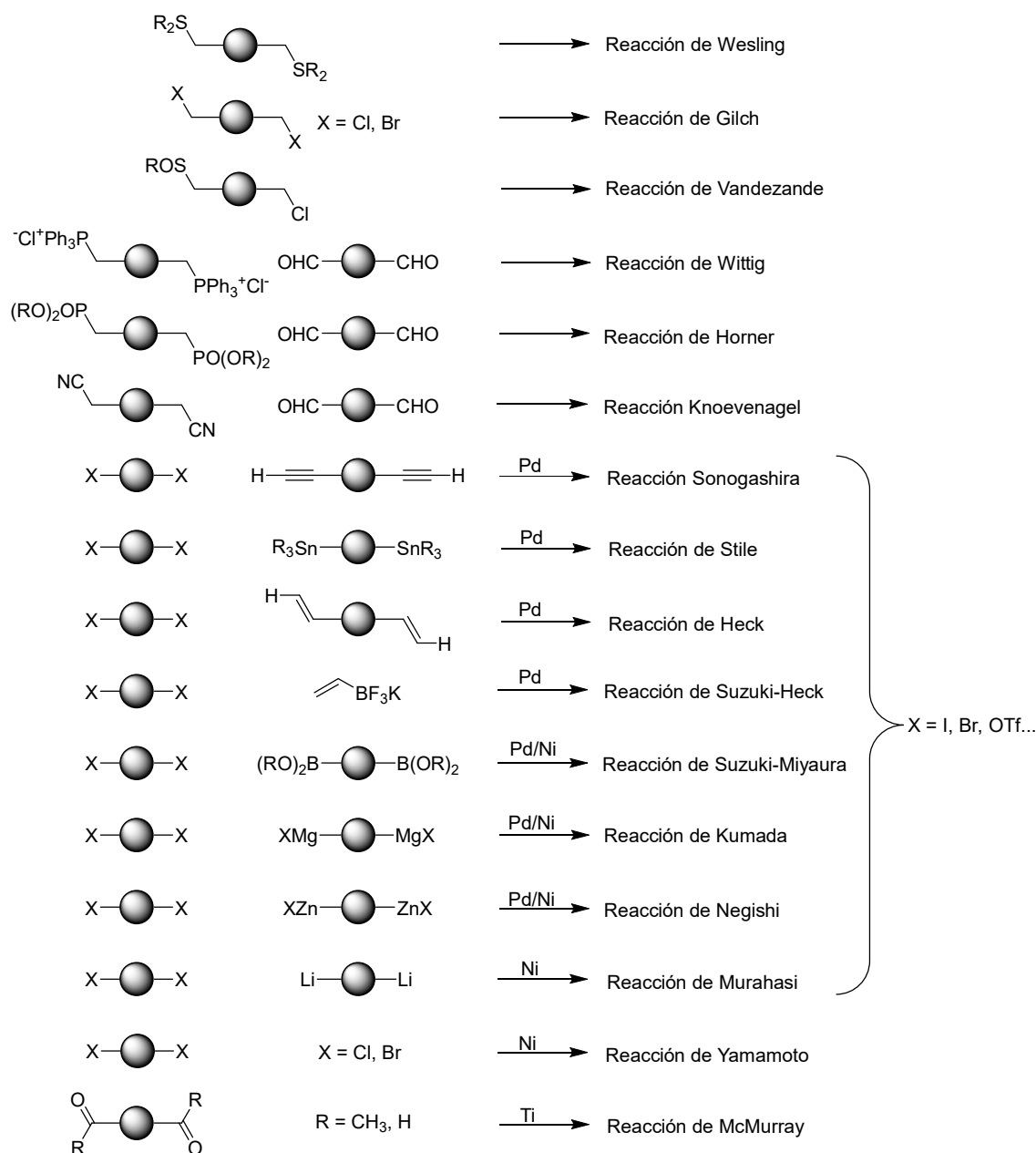


Figura 77. Ilustración de los monómeros y nombres de las reacciones de polimerización más relevantes para la obtención de polímeros conjugados.

2.1.1. Policondensación de Suzuki-Miyaura

En el desarrollo de esta Tesis se ha utilizada la reacción de Suzuki-Miyaura para llevar a cabo las diferentes polimerizaciones. Esta, junto con la reacción de Stille, son las más empleadas para la preparación de materiales funcionales que contienen sistemas de conjugación extendida unidos por enlaces C-C sp^2 .¹¹ La reacción de Stille presenta una menor reactividad y suele emplearse mayoritariamente en la síntesis de politiofenos, mientras que la reacción de Suzuki se usa más ampliamente en la síntesis de polímeros de diferente naturaleza.⁹ Además de que la reacción de Suzuki muestra compatibilidad con una variedad mucho mayor de grupos funcionales, presenta

otras grandes ventajas como son la menor toxicidad de los organoboratos utilizados —en comparación con los compuestos de estaño que se utilizan en la reacción de Stille— o la mayor estabilidad térmica y menor sensibilidad a la presencia de oxígeno y humedad de los organoboratos.¹² A continuación, se muestra a modo de ejemplo el ciclo catalítico de la policondensación de Suzuki-Miyaura, empleando los monómeros que se utilizarán para los polímeros conjugados desarrollados en la presente Tesis:

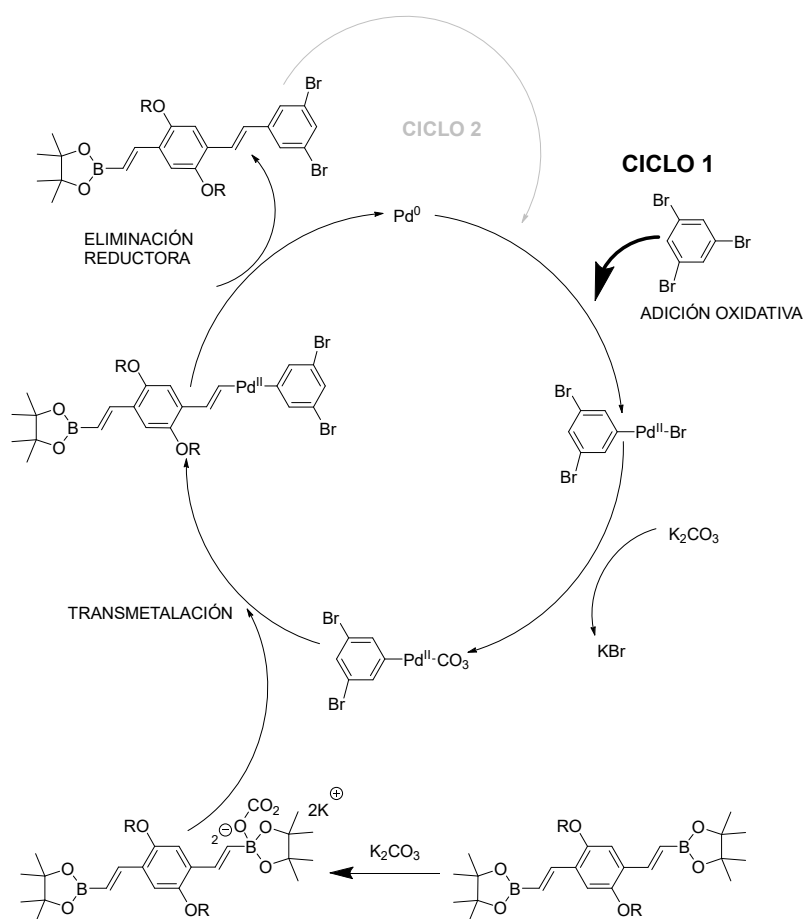


Figura 78. Ciclo catalítico de la policondensación Suzuki-Miyaura empleada para la obtención de los CLPs de la presente Tesis.

La adición oxidativa, al igual que ocurre en otras reacciones catalizadas por paladio, suele ser el paso limitante de la reacción. Este paso está determinado por el grupo saliente (R-X), disminuyendo la reactividad en el orden $\text{I} > \text{OTf} > \text{Br} > \text{Cl}$.¹⁰ Además, la presencia de grupos ricos en electrones unidos al anillo aromático influye negativamente en la reactividad.¹² La adición de una base al medio ayuda al proceso de transmetalación, ya que el éster borónico en su forma neutra no reacciona con el complejo de paladio formado tras la adición oxidativa, mientras que sí lo hace el boronato. Por tanto, la formación de un compuesto de boro cuaternario cargado negativamente aumenta la nucleofilia del alqueno directamente unido, facilitando la reacción

con el complejo de paladio.¹³ Aunque la reacción puede llevarse a cabo en presencia de bases anhidras suspendidas en disolventes orgánicos, el uso de bases inorgánicas hidratadas o la presencia de agua aumenta significativamente la velocidad de reacción.¹¹

La elección del **catalizador** es también un aspecto importante a tener en cuenta. Los catalizadores más empleados son $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}[\text{P}(p\text{-tolil})_3]_3$ y $\text{Pd}[\text{P}(p\text{-tolil})_3]_2$, especialmente para la policondensación de Suzuki. Las fosfinas desempeñan un papel crucial en la estabilización de la forma activa del $\text{Pd}(0)$.¹⁴ El número y tipo de fosfinas es también relevante. Los complejos de paladio con menos de cuatro ligandos o con una unión lábil de estos, favorecerán la reacción de Suzuki debido a que la formación de los nuevos complejos durante la adición oxidativa y la transmetalación se verá facilitada. Un ejemplo serían las reacciones con cloroarenos, las cuales no se pueden llevar a cabo con las típicas fosfinas mencionadas anteriormente pero sí con ligandos fosfinas voluminosos ($\text{P}(t\text{-Bu})_3$,¹⁵ di(adamantil)fosfina)¹⁶ que, junto con su facilidad de disociación y su carácter dador de electrones, permiten llevar a cabo estos acoplamientos incluso a temperatura ambiente. Otras fuentes de $\text{Pd}(0)$ son las sales de $\text{Pd}(\text{II})$, cuya reducción *in situ* genera el $\text{Pd}(0)$ necesario para la reacción. En estos casos la eficiencia del catalizador está relacionada con las especies iónicas que se generan con la reducción del paladio.¹⁷

Como en todas las reacciones, la pureza de los reactivos es muy importante. En las reacciones de polimerización, la presencia de impurezas en uno de los monómeros puede producir que la relación entre los monómeros varíe y, con ello, afectar significativamente al grado de polimerización, como bien demostraron Bo y Schlüter.¹⁸ En la reacción de Suzuki-Miyaura, generalmente, los problemas en cuanto a la pureza de los monómeros suelen provenir del compuesto borado. Existen dos opciones en el uso de este monómero: i) empleo del ácido borónico que suele presentar una mayor reactividad pero es muy higroscópico y tiende a hidratarse, con lo que se hace difícil cuantificar la cantidad de reactivo puro de partida, o, ii) emplear el pinacol del ácido borónico, formando un éster borónico el cuál, aunque menos reactivo, no presenta problemas de hidratación y como aliciente presenta una mayor solubilidad en disolventes orgánicos.¹⁹

Son muchos los factores a tener en cuenta para obtener los mejores resultados: la elección del disolvente o disolventes, el tipo de catalizador de transferencia de fase si estamos empleando un sistema bifásico, la estequiometría de la reacción, la naturaleza de la base, catalizador, etc. Es necesaria una búsqueda bibliográfica exhaustiva para la optimización de los parámetros de la polimerización.

3. RESULTADOS

3.1. Síntesis

Como se ha explicado en el apartado 2.1 Síntesis de este mismo capítulo (p. 158), para llevar a cabo la policondensación a través de la reacción de Suzuki-Miyaura son necesarios al menos dos grupos funcionales: un grupo orgánico electrófilo unido a un carbono sp^2 , como un haluro de arilo, y un organoborato, ya sea en forma de ácido o de éster borónico. Estos pueden estar en un mismo monómero tipo a-M-b, donde a y b es cada uno de los grupos funcionales necesarios para la polimerización, o en monómeros diferentes a-M-a y b-N-b. La gran ventaja de esta segunda estrategia se debe a la simplificación en la síntesis de este tipo de monómeros, además de permitir una síntesis “ordenada” de copolímeros alternos dador-aceptor (M-N-M-N), lo que permite ajustar las propiedades de los polímeros conjugados para las diferentes aplicaciones en optoelectrónica.¹² En las polimerizaciones con monómeros a-M-b y a-N-b, la alternancia se deberá a la reactividad de los diferentes monómeros entre sí, pudiendo obtener, por ejemplo, de forma indistinta secuencias tipo M-M-M-N-N-M-N o M-N-M-M-N-N. En la **Figura 79** se representan de forma esquemática las diferentes opciones para obtener homopolímeros o copolímeros dependiendo del tipo de monómero utilizado, siendo la síntesis de 3+4 sólo un ejemplo de los múltiples que se podrían obtener.

<u>Monómeros:</u>	<u>Síntesis de homopolímeros:</u>	<u>Síntesis de copolímeros:</u>
1) a-M-a	1 + 1 -> No se da la reacción	1 + 2 -> -M-N-M-N-M-N-
2) b-N-b	2 + 2 -> No se da la reacción	3 + 4 -> -M-M-N-N-N-M-
3) a-M-b	3 + 3 -> -M-M-M-M-M-M-	-M-N-N-M-M-N-
4) a-N-b	4 + 4 -> -N-N-N-N-N-N-	...

M : monómero funcional tipo 1
N : monómero funcional tipo 2
a : grupo funcional polimerizable tipo 1
b : grupo funcional polimerizable tipo 2

Figura 79. Representación esquemática de las posibles aproximaciones para la obtención de homopolímeros o copolímeros dependiendo del tipo de monómeros empleados.

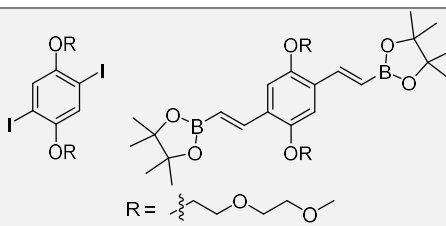
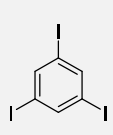
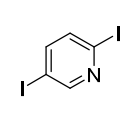
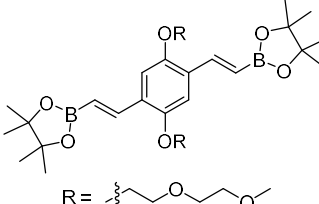
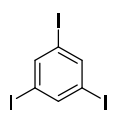
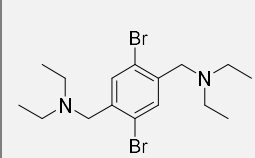
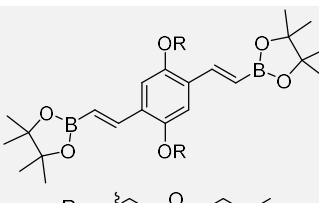
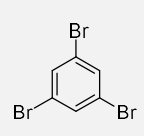
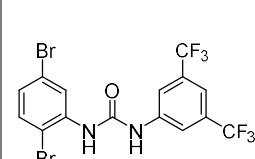
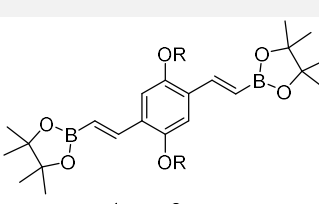
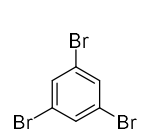
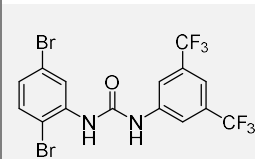
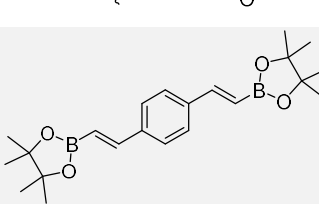
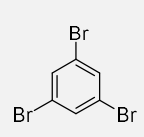
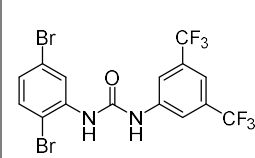
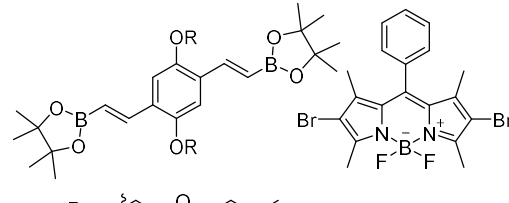
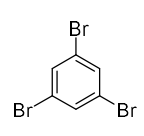
En la presente Tesis, para la síntesis de los copolímeros se ha optado por la segunda opción, es decir, la utilización de monómeros tipo a-M-a / b-N-b. De este modo, se hace necesaria la síntesis de dos tipos de monómeros, uno de ellos dotado del grupo funcional encargado de *interaccionar* con los analitos de interés (monómero funcional) y el otro sin grupos funcionales específicos, que simplemente es necesario para que se dé la reacción (monómero estructural). En el caso de esta Tesis, se añade además al medio de reacción, un tercer monómero con tres grupos polimerizables, llamado monómero *entrecruzante*, con la finalidad de desarrollar polímeros conjugados luminiscentes con impronta molecular (PCLIMs). Como se explicó en el capítulo 1, el papel del monómero entrecruzante es desarrollar una estructura polimérica entrecruzada y por

tanto insoluble, para la formación de cavidades estables las cuales se encargarán del reconocimiento molecular proporcionando al sistema la selectividad necesaria.²⁰

Como ya se comentó en el capítulo introductorio de esta Tesis, fue en 2007 cuando el grupo de Nesterov²¹ describió, por primera vez, el uso de polímeros conjugados luminiscentes con (presunta, no demostrada) impronta molecular (PCLIMs). Desde esa fecha solo se han publicado otros dos artículos en los que se combine el concepto CLP y MIP,²²⁻²³ por lo que el objetivo de esta Tesis se consideró muy novedoso y a la vez ambicioso por su complejidad.

La **Tabla 10** resume los diferentes monómeros empleados para cada una de las polimerizaciones llevadas a cabo en esta Tesis.

Tabla 10. Resumen de los monómeros empleados para la síntesis de los diferentes CLPs desarrollados en esta Tesis.

POLÍMERO	MONÓMERO FUNCIONAL	MONÓMEROS ESTRUCTURALES	MONÓMERO ENTRECruzANTE
1 SIN GRUPOS RECEPTORES			
2 SENSIBLE A GRUPOS ÁCIDOS			
3 SENSIBLE A GRUPOS ÁCIDOS			
4A SENSIBLE A ANIONES CARBOXILATO			
4B SENSIBLE A ANIONES CARBOXILATO			
5 SENSIBLE A ANIONES CARBOXILATO			

3.2. Síntesis de monómeros

3.2.1. Síntesis de monómeros estructurales

Para la síntesis de los monómeros estructurales se tomó como artículo de referencia el trabajo de Nesterov;²¹ la **Figura 80** muestra los resultados obtenidos en esta Tesis.

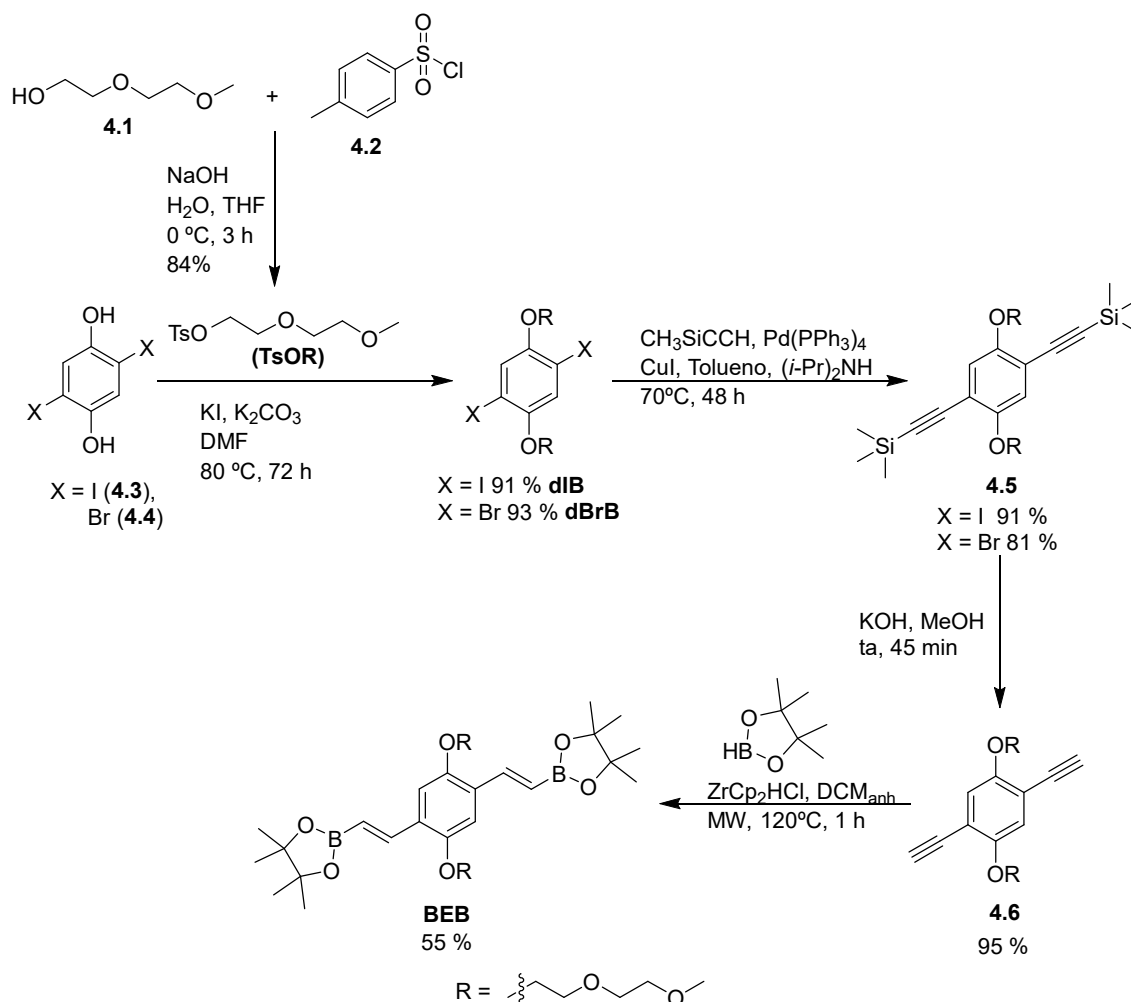


Figura 80. Procedimiento utilizado para la obtención de los monómeros estructurales **dIB**, **dBrB** y **BEB**.

La ruta planteada consta de cinco pasos en los cuales se obtienen los dos monómeros estructurales necesarios para la policondensación de Suzuki-Miyaura, siendo **dIB** y **dBrB** los haluros de arilo con yodo y bromo, respectivamente y **BEB** el monómero con grupos boronato. Es interesante remarcar que el precursor de este último, el compuesto **4.6**, posee triples enlaces que podrían utilizarse para la obtención de polímeros conjugados con triples enlaces a partir de la reacción de acoplamiento de Sonogashira. Aun así, en esta Tesis no se ha llegado a utilizar la ruta Sonogashira ya que los triples enlaces introducirían demasiada rigidez en el CLP para una futura impronta molecular apropiada.

Para la adición de las cadenas alcoxídicas (reacción 2, **Figura 80**) es necesario un paso previo para convertir el hidroxilo de la molécula **4.1** en un buen grupo saliente, para lo cual se empleó el cloruro de *p*-toluensulfonilo (**4.2**). Una vez realizada la tosilación (**TsOR**), se procedió a la incorporación de la cadena alcoxídica al monómero a través de una reacción de sustitución nucleófila S_N2 entre el tosilato **TsOR** y las dihalohidroquinonas **4.3** ó **4.4**. El principal motivo de la incorporación de estas cadenas es aumentar la solubilidad del monómero en el medio de reacción.^{4, 9} Además, las cadenas alcoxídicas favorecen las interacciones por apilamiento π - π , que darían como resultado unas interacciones supramoleculares más favorables con una plantilla aromática.²⁴

En este segundo paso se cambió el disolvente empleado por Nesterov,²¹ butanona, por DMF para evitar problemas de precipitación del producto, obteniéndose mejores rendimientos tanto para la molécula diyodada (**dIB**) como para la dibromada (**dBrB**).

Se procedió a continuación a la incorporación de los triples enlaces. Para ello se hizo uso del etiniltrimetilsilano, acetileno protegido por un silano, fácilmente eliminable una vez completada la reacción. Se trata de una reacción de acoplamiento C-C catalizada por paladio tipo Sonogashira, ampliamente descrita en bibliografía. Se utilizaron las condiciones estándar de dicha reacción obteniéndose buenos rendimientos. Como era de esperar, al ser el bromo un peor grupo saliente, el rendimiento obtenido para la molécula **4.5** partiendo de la molécula dibromada (**dBrB**, 81 %) fue algo inferior al que se obtuvo empleando la molécula diyodada (**dIB**, 91 %). La aparición de un singlete intenso a 0.23 ppm que integra por 18H correspondiente a los CH₃ del trimetilsilano se utilizó para confirmar la obtención de la molécula (**Figura 207**, p. 284). La desaparición de esta señal, junto con la aparición de un singlete a 3.32 ppm, menos intenso y correspondiente a 2H, asignado a los triples enlaces, corroboraron el éxito de la posterior eliminación del grupo protector (**Figura 209**, p. 285). Esta reacción se llevó a cabo en medio básico, obteniendo el dietinilbenceno **4.6** con un elevado rendimiento (95%).

El último paso para la obtención del monómero **BEB**, consistió en la incorporación del diéster borónico (pinacolborano) al monómero **4.6** a través de una adición hidrometálica, empleando como catalizador el reactivo de Schwartz, ZrCp₂HCl,²⁵ cuyo posible ciclo catalítico basado en la adición oxidativa y la posterior reducción eliminativa²⁶ se presenta en la **Figura 81**.

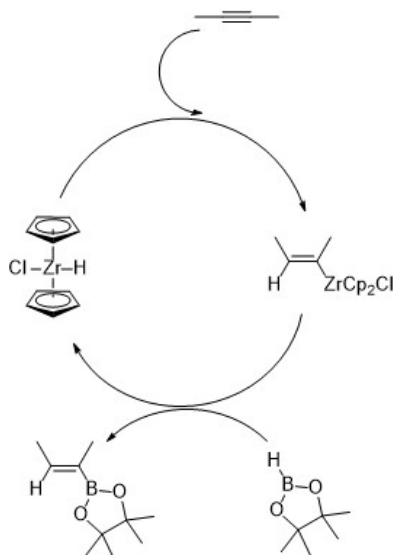


Figura 81. Posible ciclo catalítico para la hidroboración de alquinos empleando el catalizador de Schwartz.

En 1992, Knochel, utilizó por primera vez el pinacolborano para la hidroboración de alquinos y alquenos empleando condiciones de reacción poco agresivas.²⁷ Ya de por sí esto es una gran ventaja frente a los otros dioxoborolanos, como el catecolborano, que se empleaban hasta la fecha y precisaba de temperaturas muy superiores. Este nuevo éster borónico, además de reducir considerablemente las temperaturas y los tiempos de reacción, era tolerante con la presencia de muchos grupos funcionales como yodo, cloro, ésteres, cetonas, éteres, aminas terciarias, nitrilos, etc.,²⁷ y conseguía aumentar considerablemente la regio/estereoselectividad, llegando a obtener el producto deseado (hidroboración *trans* en el C terminal) con más de un 95 % de rendimiento.²⁷⁻²⁸ Con el catalizador de Schwartz se consiguió además incrementar adicionalmente el rendimiento de la reacción.²⁶ Pereira y Srebnik²⁶ determinaron que la reacción de un equivalente de 1-octino con 1.05 equivalente de pinacolborano en presencia del catalizador ZrCp_2HCl (5 mol %) en DCM a 25 °C durante 24 h, proporcionaba el producto deseado prácticamente puro, con un rendimiento mayor del 93% (**Figura 82**), mientras que sin el catalizador el rendimiento de la reacción descendía al 20%.

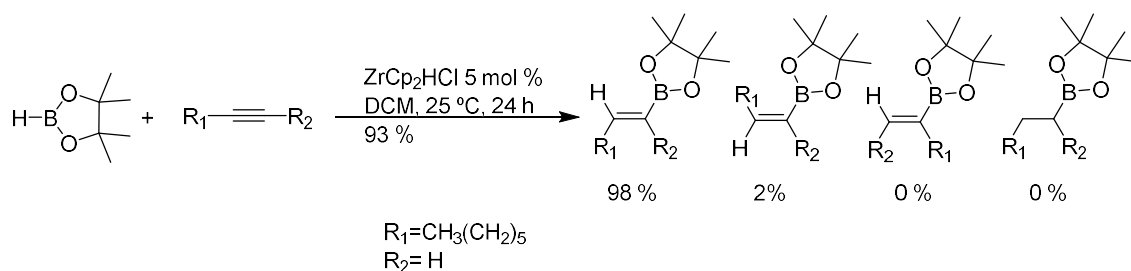


Figura 82. Posibles isómeros obtenidos tras la hidroboración de un alquino empleando el catalizador de Schwartz y el pinacolborano.²⁶

En este caso, el monómero **4.6** presenta dos grupos etinilo, con lo que hace necesaria la adición de al menos 2 equivalentes de pinacolborano. Desafortunadamente, a la hora de llevar a cabo la reacción siguiendo el procedimiento descrito por Nesterov,²¹ no se obtuvo resultado alguno. Por este motivo se optó por recurrir a la síntesis asistida por microondas. Este método permite trabajar a presiones superiores a la presión atmosférica, pudiendo utilizar temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente empleado. De esta forma, se facilitan las colisiones entre los reactivos, lo que conlleva un aumento de la reactividad y una reducción del tiempo de reacción. Además, la disminución del tiempo de reacción reduce la formación de productos secundarios, simplificando los procesos de purificación y aumentando el rendimiento de la reacción.²⁹

Para llevar a cabo la reacción con activación por microondas, se tuvo especial cuidado en evitar la presencia de oxígeno en el recipiente de reacción y de posibles trazas de agua. El DCM que se utilizó se destiló previamente en presencia de CaH_2 y se purgó exhaustivamente el sistema con argón. El éxito de la reacción en microondas se puso de manifiesto por un aumento drástico de la fluorescencia de la disolución. En el espectro de ^1H -RMN del monómero **BEB** (Figura 211, p. 286) se observa la aparición de dos nuevos dobletes, con una constante de acoplamiento de 18.5 Hz, que se corresponderían con la transformación de los triples enlaces en enlaces dobles. Una de estas señales no aparece en la región característica de los dobles enlaces, sino a un desplazamiento químico muy superior debido al desapantallamiento producido por el anillo aromático. El singlete correspondiente a los metilos del éster borónico no se obtuvo como una única señal; pese a ello, la integral total suma los 24 protones que cabría esperar. Mediante espectrometría de masas (ESI^+ , calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{B}_2\text{O}_{10}\text{Na}^+$ 641.3; encontrado 641.3) se terminó de confirmar la obtención del monómero estructural **BEB** (Figura 213, p. 287).

Al igual que se describe en el capítulo 3, se quiso estudiar la influencia de las cadenas laterales. Por ello se procedió a la síntesis del monómero estructural **DVB** (Figura 83).

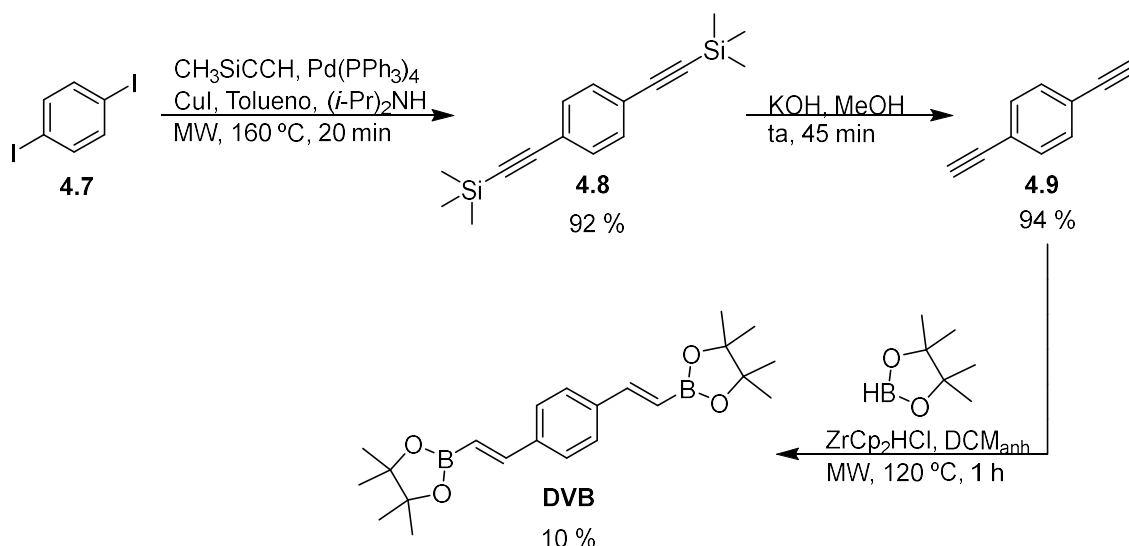


Figura 83. Procedimiento seguido para la obtención del monómero estructural DVB.

En este caso, gracias a la ayuda del reactor de microondas, el tiempo de reacción del primer paso para la obtención del bis(pinacolborano) **DVB** (síntesis de **4.8**), se pudo disminuir de 72 h (necesario para la obtención de la molécula **4.5**), a 20 min, con una disminución significativa de la formación de subproductos y facilitando la purificación por cromatografía en columna.

La gran limitación de esta ruta fue, de nuevo, la hidroboración del triple enlace. Siguiendo el mismo procedimiento que para el caso anterior, no se pudo obtener un rendimiento superior al 10 %. Como ya se discutió en el capítulo 3 en la síntesis del compuesto **3.18**, parece ser que sustituyentes ricos en electrones, como el $-\text{OMe}$, favorecen este tipo de reacción. Esto último no se ha podido contrastar en bibliografía. Estudios parecidos, pero que emplean otro tipo de catalizador, muestran una gran disparidad de resultados.³⁰⁻³³ La obtención de los diferentes intermedios de síntesis se determinó fácilmente por ^1H -RMN. Por ejemplo, en el espectro de ^1H -RMN del monómero final **DVB** (**Figura 218**, p. 290) se observa a 7.45 ppm un singlete que integra por 4 H correspondiente a las señales aromáticas; dos dobletes, uno a 7.37 ppm ($J = 18.40$ Hz) y otro a 6.17 ppm ($J = 18.40$ Hz), que pertenecen a los dobles enlaces en *trans* y un singlete muy intenso a 1.32 que integra por los 24 H de los diferentes CH_3 .

Por último, y con el objetivo de intentar disminuir la separación de la energía entre los orbitales HOMO y LUMO de los CLPs, a fin de obtener un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción y emisión, se preparó un derivado bromado de un fluoróforo tipo BODIPY (**MBDPY**). Partiendo de un BODIPY comercial (**4.10**) se realizó la bromación de las posiciones 2 y 6 (**Figura 84**).

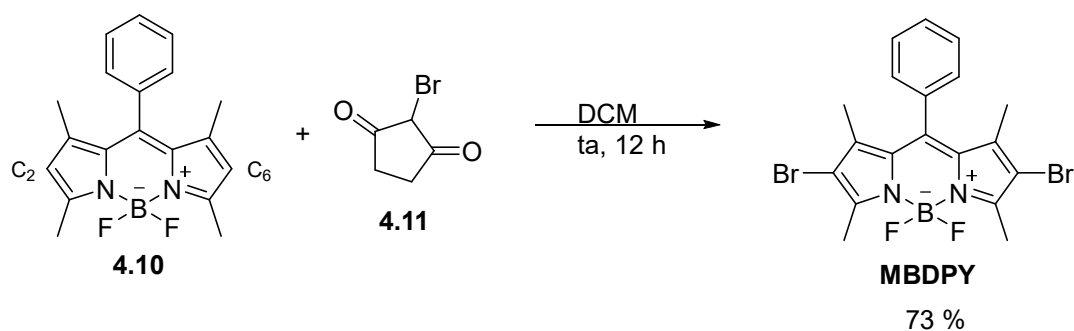


Figura 84. Halogenación electrofílica de las posiciones 2 y 6 del BODIPY 4.10 con NBS.

Un primer intento se llevó a cabo con Br_2 disuelto en DCM, pero eran condiciones demasiado drásticas que condujeron a la bromación de los metilos en posición 3- y 5- además de las posiciones 2- y 6-, como se pudo comprobar por ^1H -RMN. Se llevó a cabo un segundo intento utilizando condiciones mucho menos agresivas. En este caso se empleó la *N*-bromosuccinimida (NBS) (**4.11**) como fuente de bromo, que genera de una forma más controlada y a menores concentraciones el bromo necesario para producir la bromación electrofílica de las posiciones deseadas. **MBDPY** se obtuvo así con un rendimiento superior al 70 %. La estructura se confirmó por la desaparición de la señal de ^1H -RMN a 6 ppm correspondiente a los protones en posición 2- y 6- (**Figura 220**, p. 291).

3.2.2. Síntesis de monómeros funcionales

Para la síntesis de polímeros conjugados fluorescentes se emplearon dos tipos diferentes de monómeros funcionales:

- i. Por una parte (**Figura 85**) se emplearon aminas que pudieran ser sensibles a la presencia de grupos ácidos: a) la 2,4-diiodopiridina (**MdIP**) comercial, en analogía al bloque precursor **BSP** (capítulo 3); b) la *N,N'*-((2,5-dibromo-1,4-fenilen)bis(metilen))bis(*N*-etil-etanolamina) (**MNet2**), en analogía al bloque precursor **BSNet2** (síntesis descrita en el capítulo 3), para detección de especies ácidas vía inhibición de un proceso PET.

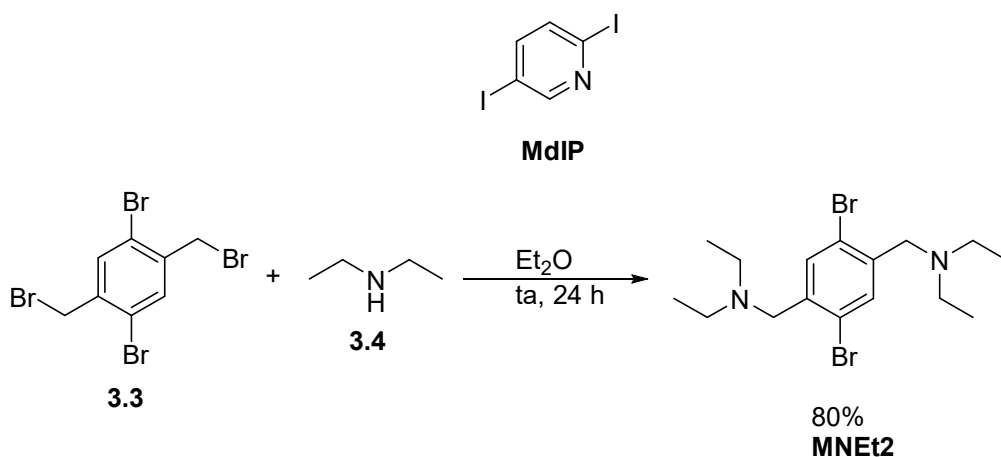


Figura 85. Procedimiento seguido para la obtención del monómero funcional MNEt2 y estructura del monómero comercial MdIP sensibles a ácidos.

- ii. Por otra, se preparó el monómero funcional urea (**MU**, **Figura 86**) para la detección del anión carboxilato (síntesis descrita en el capítulo 3).

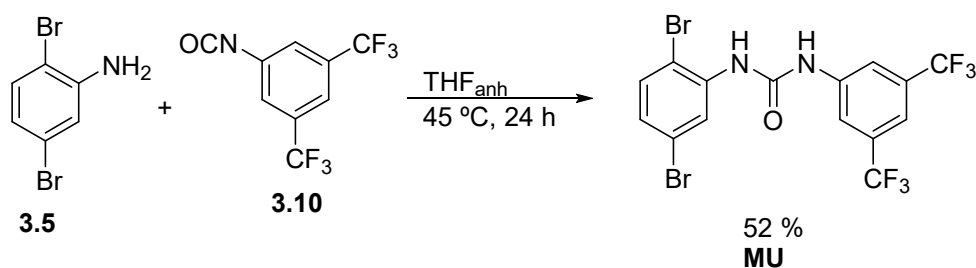


Figura 86. Procedimiento seguido para la obtención de monómero funcional MU sensible a carboxilatos.

El bajo rendimiento que se obtuvo (52 %) se atribuye a las complicaciones de la purificación. Debido a la pobre solubilidad del producto final en DCM, disolvente con el que se obtenía la mejor resolución de R_f por CCF, el producto no era arrastrado eficientemente por el eluyente con lo que acababa juntándose con las impurezas antes de finalizar su elución completa. Tras varias pruebas de eluyentes se optó por mantener el DCM y la realización de una segunda o tercera columna sucesiva de cromatografía.

3.2.3. Síntesis de polímeros conjugados luminiscentes

En primer lugar se sintetizó un polímero sin grupos receptores para utilizarlo de referencia como esqueleto principal del resto de CLPs. La síntesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el trabajo de Nesterov (*"Chemosensory Performance of Molecularly Imprinted Fluorescent Conjugated Polymer Materials"*).²¹ Así, se llevó a cabo la polimerización a través de una reacción de acoplamiento C-C sp^2 catalizada por paladio tipo Suzuki. Se empleó un sistema bifásico para favorecer la formación de micropartículas.³⁴ En este tipo de polimerizaciones la

reacción tiene lugar en pequeñas gotas que se forman gracias a la agitación vigorosa. Con este fin se emplean tres disolventes, dos de ellos totalmente inmiscibles, tolueno y agua, y un tercero, etanol, parcialmente soluble en tolueno, para facilitar la mezcla de ambas fases. Para favorecer la interacción de los disolvente se añade además un surfactante al medio (dodecil sulfato de sodio). En la **Figura 87** se describe el procedimiento para la síntesis de este primer polímero.

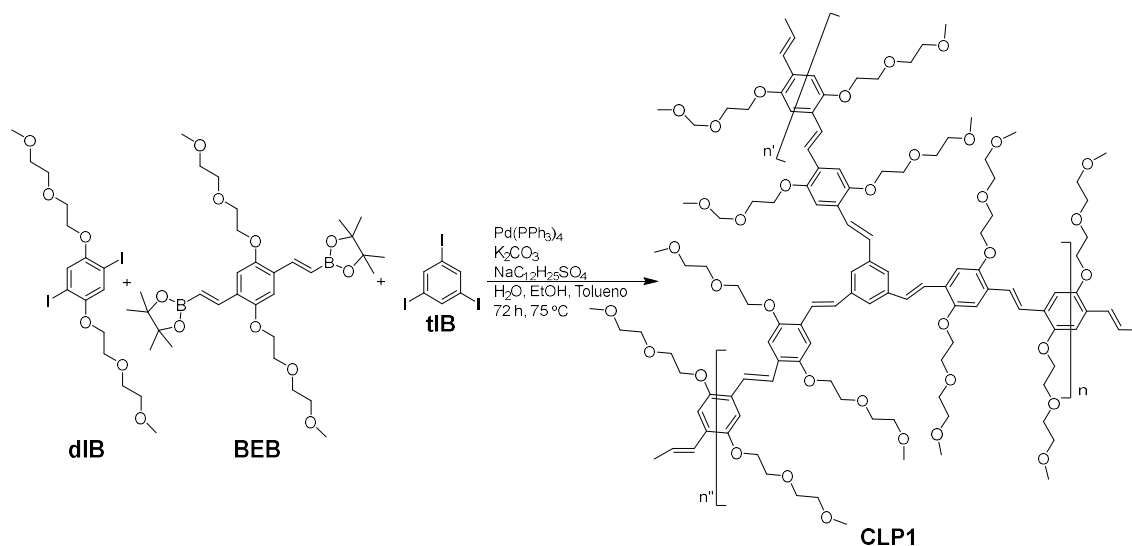


Figura 87. Condiciones de la policondensación Suzuki-Miyaura por microemulsión para la obtención del CLP1.

Para establecer los equivalentes necesarios de cada monómero se tuvo en cuenta los grupos funcionales reactivos que aportaba cada una de las moléculas. Por cada equivalente del monómero triyodado (**tIB**) se añadieron 1.5 equivalentes del **dIB** y 3 del **BEB**; de esta forma, se conseguía mantener una relación 1:1 entre los grupos funcionales yodo (1 eq de **tIB** con 3 unidades de yodo por molécula más 1.5 eq de **dIB** con 2 unidades de yodo por molécula proporcionan un total de 6 grupos yodo) y éster borónico (3 eq de **BEB** con 2 unidades borónicas por molécula dando 6 grupos boronato en total). Después de tres días de reacción, se observó la aparición de un precipitado marrón, insoluble en una gran variedad de disolventes: agua, etanol, tolueno, acetato de etilo, dimetilsulfóxido o dimetilformamida, indicativo del alto grado de entrecruzamiento del polímero.

Para la síntesis de CLPs entrecruzados con receptores para ácidos carboxílicos se procedió de manera similar:

- i. En la síntesis del **CLP2a** se sustituyeron los equivalentes de **dIB** empleados en la síntesis del **CLP1** por el monómero funcional **MdIP** (**Figura 88**).

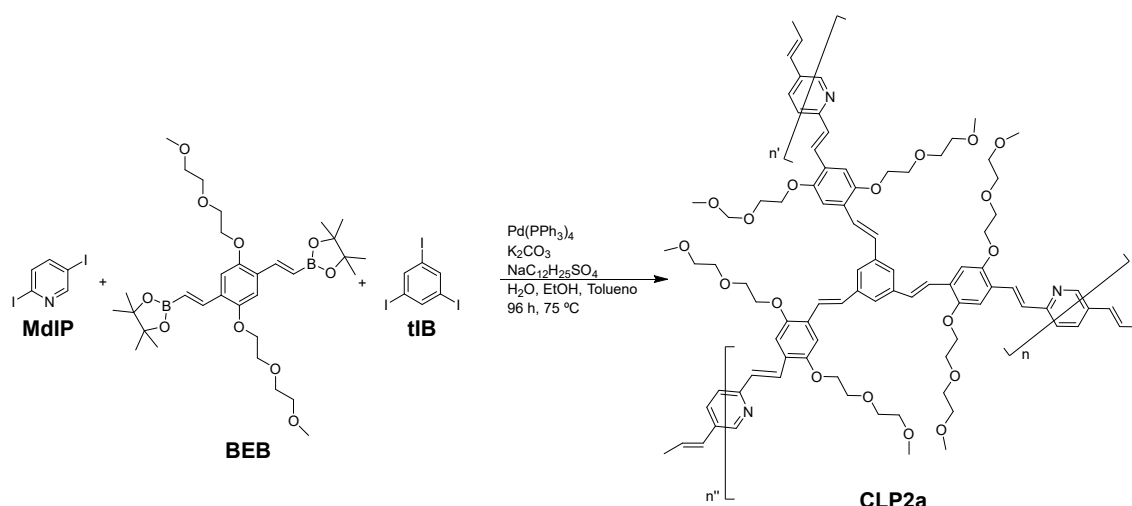


Figura 88. Policondensación Suzuki-Miyaura por microemulsión para la obtención del CLP2a, polímero con grupo piridina para el reconocimiento de especies ácidas.

- ii. Para el **CLP3** se sustituyó el dibromo derivado **dIB** por el **MNEt2**; debido a que el monómero funcional es un bromuro de arilo el monómero entrecruzante también se tuvo que adaptar. En este caso el triyodobenceno se sustituyó por tribromobenceno (**tBrB**) (**Figura 89**).

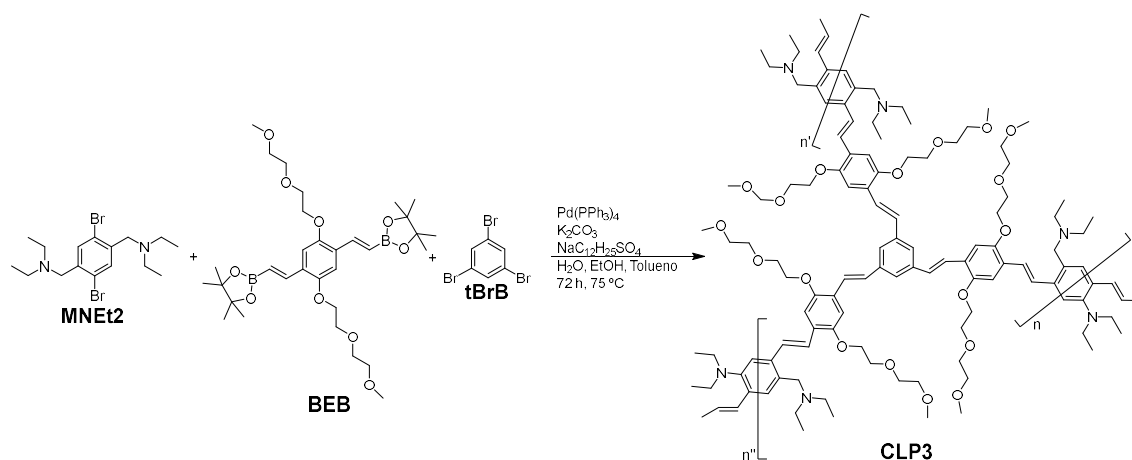


Figura 89. Policondensación Suzuki-Miyaura por microemulsión para la obtención del CLP3, polímero con grupos dietilamina para el reconocimiento de especies ácidas.

Mediante la polimerización en suspensión, también llamada por microemulsión, se esperaba obtener partículas de un tamaño inferior a $10\text{ }\mu\text{m}$ ³⁴⁻³⁵ sin embargo en todos los casos (**CLP1**, **CLP2a**, **CLP3**) se obtuvieron tamaños de partículas superiores a los $50\text{ }\mu\text{m}$ y poco porosas (ver imágenes obtenidas por SEM en la **Figura 90**). Los sólidos obtenidos se caracterizaban por presentar una luminiscencia intensa, observable a simple vista con la ayuda de una lámpara UV de mano (**Figura 90**).

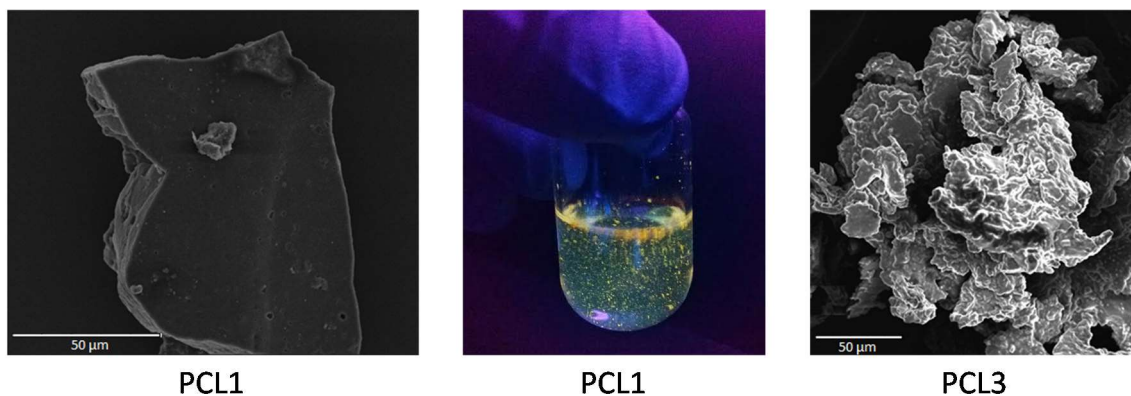


Figura 90. Izquierda y derecha: imágenes obtenidas por SEM de los polímeros CLP1 y CLP3. Centro: fotografía de partículas en suspensión del CLP1 con iluminación ultravioleta (λ_{exc} 365 nm).

Para la síntesis de CLPs con impronta, hay que tener en cuenta que es recomendable evitar el uso de disolventes próticos como el etanol o el agua, especialmente cuando se pretende realizar la impronta con plantillas iónicas (con una fuerte solvatación en estos medios) o mediante interacciones por enlace de hidrógeno, ya que la competición del disolvente es demasiado elevada e impide la formación del complejo monómero funcional-plantilla. Por ello, se decidió probar condiciones de síntesis de CLPs entrecruzados, sin empleo de disolventes próticos. Al no haber un sistema bifásico, no tiene sentido añadir un surfactante. También fue necesario cambiar la base por *t*-BuOK, más soluble que el K_2CO_3 en disolventes orgánicos. Al eliminar el sistema bifásico, la polimerización deja de tener lugar en las microesferas de la emulsión. Para evitar la obtención de partículas demasiado grandes, se decidió diluir la mezcla de reacción, pasando de los 15 mL de la mezcla de disolventes a 100 mL de tolueno. Esta técnica de polimerización se conoce como polimerización por precipitación. El polímero va creciendo hasta cierto tamaño, para el que se produce la precipitación antes de seguir reaccionando, ya que la dilución provoca que la probabilidad de encontrar un nuevo monómero con el que reaccionar antes de precipitar, por el propio peso de la cadena, se reduzca enormemente.³⁴ Introducidos estos cambios y manteniendo las cantidades de reactivo, se repitió la síntesis del polímero **CLP2a** como se esquematiza en la **Figura 91**, para dar lugar al **CLP2b**.

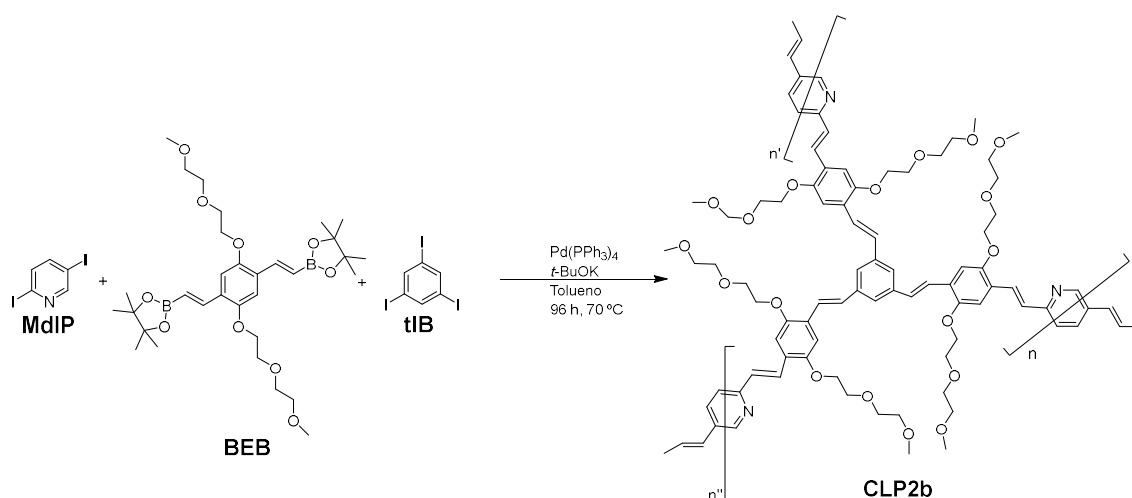


Figura 91. Policondensación Suzuki-Miyaura por precipitación para la obtención del CLP2b, polímero con grupos piridinas para el reconocimiento de especies ácidas.

Se obtuvo de nuevo un precipitado marrón, cuyo tamaño de partícula se caracterizó por SEM (Figura 92), donde se observa que gracias al método de polimerización por precipitación se consiguió reducir el tamaño de las partículas y aumentar la porosidad. Aun así no se llegaron a obtener partículas esféricas discretas, sino más bien aglomerados, lo cual puede suponer una menor accesibilidad del analito.

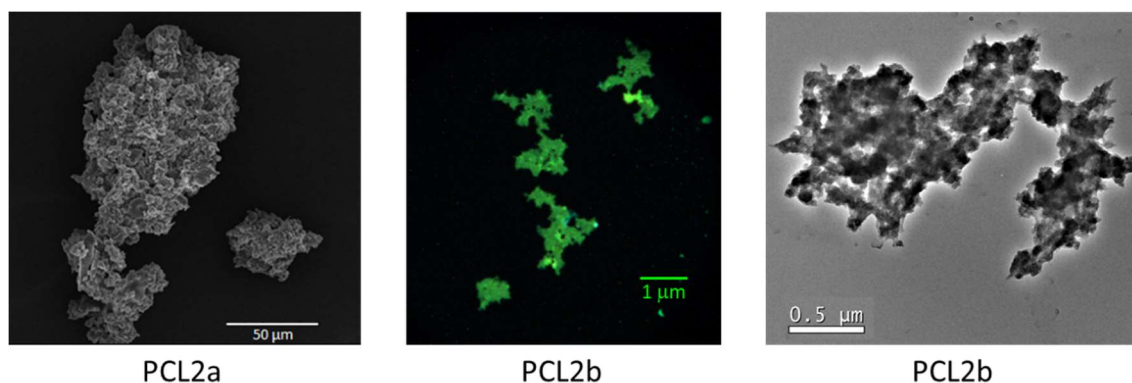


Figura 92. Derecha e izquierda: comparación del tamaño de partículas obtenidos por diferentes técnicas de polimerización CLP2a microemulsión y PBCL2b por precipitación, imágenes obtenidas por SEM. Centro: imagen del CLP2b obtenida a través de microscopía de tiempo de vida de imagen de fluorescencia (FLIM).

Para la síntesis de los CLPs derivados de urea fue necesario cambiar de nuevo el disolvente de la polimerización, ya que el monómero urea (**MU**, Figura 93) no era soluble en tolueno. En este caso la reacción se llevó a cabo en DMF anhidra y, además, se decidió utilizar como base el carbonato de cesio que presenta una solubilidad aceptable en este medio. Se obtuvieron así dos tipos de polímeros (Figura 93):

- i. **CLP4**, con cadenas laterales con grupos alcóxido, dadores de electrones.

ii. **CLP5**, omitiendo las cadenas laterales.

Lamentablemente no se pudo sintetizar un tercer polímero con cadenas laterales con grupos aceptores de electrones, ya que la síntesis del monómero urea correspondiente no fue posible (ver capítulo 3).

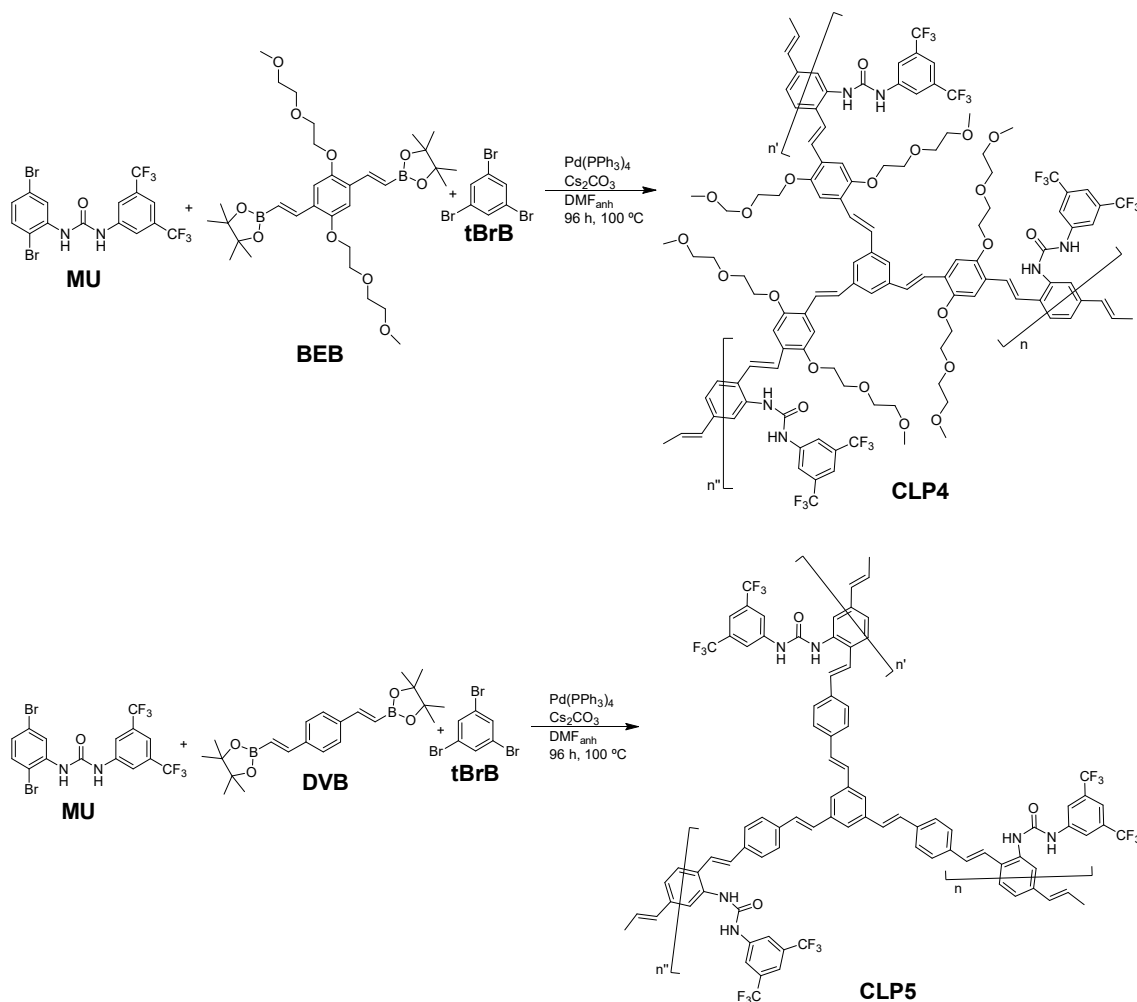


Figura 93. Policondensación Suzuki-Miyaura por precipitación para la obtención de los polímeros CLP4 y CLP5, para el reconocimiento de aniones carboxilato.

En ambos casos se obtuvo un polvo marrón insoluble que se molturó para su posterior caracterización óptica.

Finalmente se sintetizó el polímero con unidades BODIPY incorporadas a la cadena principal (**CLP6**) (**Figura 94**). Se siguió el mismo procedimiento que para la síntesis del **CLP4** y **CLP5**, obteniéndose un polvo más rojizo. Para comprobar la incorporación del fluoróforo BODIPY en el polímero, se hizo un seguimiento de las aguas de lavado, sin que se llegase a detectar la absorción ni la emisión característica del BODIPY, indicativo de la inmovilización del cromóforo en el polímero.

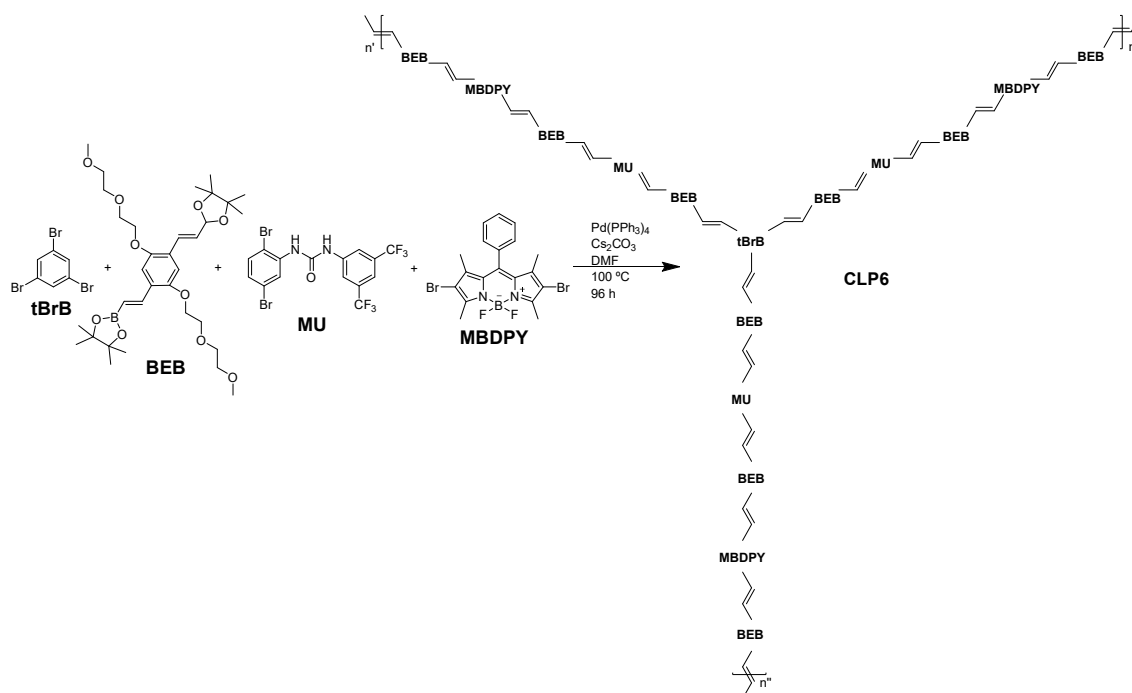


Figura 94. Condiciones de la policondensación Suzuki-Miyaura por precipitación para la obtención del CLP6, polímero con grupos funcionales sensibles a la presencia de carboxilatos y empleando un BODIPY bromado como monómero estructural.

3.3. Caracterización óptica

Todos los CLPs obtenidos en el apartado 3.2.3 Síntesis de polímeros conjugados luminiscentes (p. 174) en forma de sólido marrón insoluble, fueron molidos en un mortero de ágata y suspendidos en ACN grado espectroscópica ($c_{\text{stock}} \approx 0.5 \text{ mg/mL}$ en todos los casos).

De cada disolución stock se tomaron 250 μL y se añadieron a la cubeta de fluorescencia que contenía 2.5 mL de ACN. Se repitió el proceso en tres ocasiones y en días diferentes y se registró la emisión, observando que la intensidad de la emisión de la suspensión del sólido correspondiente se mantenía constante en los triplicados, asegurando la reproducibilidad de las medidas.

En la **Figura 95** se muestran las gráficas con los espectros de emisión y excitación obtenidos para la suspensión en ACN de los distintos polímeros. El elevado grado de dispersión de la luz de las suspensiones de los sólidos hizo imposible la obtención de los espectros de absorción. En la **Tabla 11** se resumen los máximos de emisión y excitación para cada polímero.

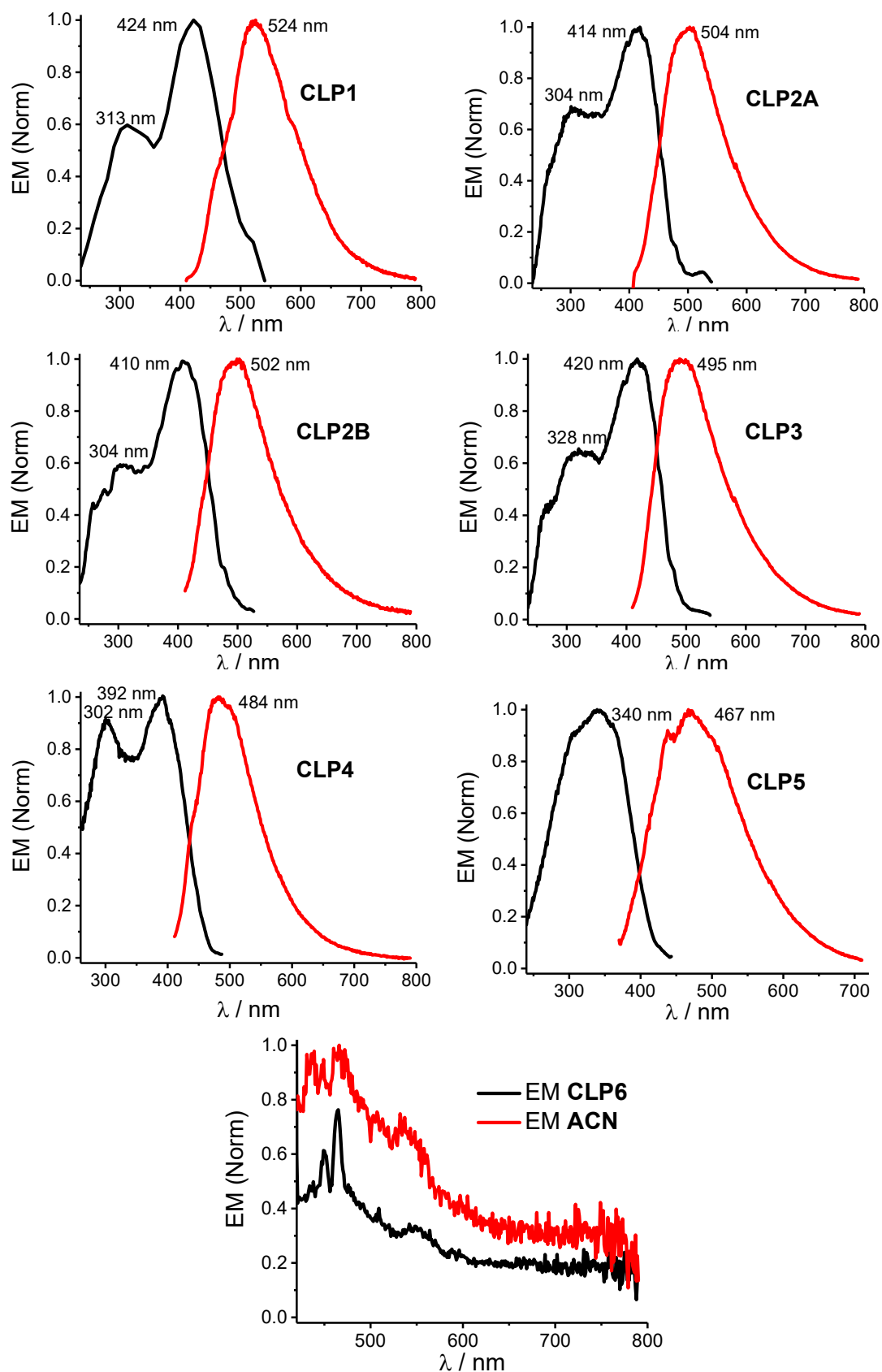


Figura 95. Espectros de fluorescencia para suspensiones en ACN ($c \approx 0.05$ mg/mL) en suspensión de los diferentes CLPs en acetonitrilo. Rojo espectros de emisión. Negro espectros de excitación CLP1 y 4: λ_{EM} 500 nm, λ_{exc} 400 nm, CLP2A, 2B y 3: λ_{EM} 550 nm, λ_{exc} 400 nm, CLP5: λ_{EM} 460 nm, λ_{exc} 360 nm; CLP6: comparación de la señal del espectro de emisión del polímero (rojo) vs. ACN puro (negro) (λ_{exc} 400 nm).

Tabla 11. Datos espectroscópicos (máximos de excitación y emisión) para suspensiones de los distintos CLP en ACN.

CLP	λ_{exc}^{Max} (nm)	λ_{em}^{Max} (nm)
"CLP1" BIBLIOGRAFÍA ²¹	425; 325	550
CLP1	424; 313	524
CLP2A	414; 304	504
CLP2B	410; 304	502
CLP3	420; 328	495
CLP4	392; 302	484
CLP 5	340	467
CLP 6	a)	a)

^{a)}Polímero no fluorescente (ver Figura 95)

A modo de comparación se ha añadido en la **Tabla 11** una fila con los datos del CLP obtenido en la ref.²¹ análogo al **CLP1**.

Se puede observar que el espectro de excitación del **CLP1**, sintetizado en esta Tesis, es muy similar al del artículo de Nesterov,²¹ pese a contener este último un ácido carboxílico en su cadena. No obstante, el máximo de emisión sí difiere significativamente el uno del otro. La presencia del ácido carboxílico, electroatractor, puede ser el responsable de este aumento en la longitud de onda de emisión. Por otro lado hay que tener en cuenta que se están empleando disolventes de diferentes en las medidas (ACN en esta Tesis versus DCM en el trabajo de Nesterov).

Además de la diferente fuerza electrodonadora/electroatractora de las cadenas laterales de los distintos CLPs, otro factor que puede influir en la posición de las bandas espectrales es la longitud de las unidades poliméricas. Una mayor longitud de polímero implicaría una mayor conjugación electrónica y, presumiblemente, un desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción y emisión. Desafortunadamente, al tratarse de polímeros entrecruzados, no fue posible evaluar la longitud del polímero mediante la determinación del peso molecular promedio (por cromatografía de exclusión, por ejemplo) ya que se trata de polímeros insolubles.

Mientras que en el caso del bloque precursor bis(estilbeno) **DSB** (capítulo 3) la introducción tanto de grupos piridina (**BSP**) como urea (**BDSU**, **BMSU**, **BPSU**) causaba un desplazamiento del

máximo de emisión (a 408 nm en ACN) a mayores longitudes de onda, en el caso de los polímeros se observa en los 4 casos un desplazamiento hipsocrómico con respecto al máximos de emisión del CLP referencia, **CLP1** (λ_{EM} 524 nm). Esto se podría explicar por el grado de polimerización. El monómero urea y el resto de monómeros nitrogenados pueden desactivar el catalizador dificultando el avance de la reacción.³⁶ Así la policondensación acaba siendo menos efectiva y se obtienen polímeros de cadenas más cortas, por tanto, con una menor conjugación electrónica y con máximos de emisión desplazados al azul.³⁷⁻³⁸

Finalmente, y como ya se ha comentado, el polímero **CLP6** se preparó en un intento por obtener materiales con una emisión en la zona roja del espectro, con mayores ventajas para aplicaciones analíticas. Tal y como se describe en la bibliografía, la incorporación de cromóforos BODIPY en las cadenas de CLPs, puede conducir a materiales con $\lambda_{EM} > 500$ nm e incluso en el infrarrojo cercano.³⁹ Por ejemplo, en la referencia 40 (*"Color-Tunable Solid-State Emission of 2,2'-Biiindenyl-Based Fluorophores"*)⁴⁰ se obtienen materiales con $\lambda_{EM} \approx 700$ nm mediante la sustitución de un fenilo por un BODIPY. Desafortunadamente, en el caso del **CLP6** se obtuvo un material no fluorescente. El motivo podría ser una transferencia de energía no radiante entre grupos dadores y aceptores del polímero, como describen algunos autores.⁴¹⁻⁴³

3.4. Valoración de la respuesta óptica de los CLPs a la presencia de diferentes analitos

Tras la caracterización óptica de los diferentes CLPs se procedió a estudiar su respuesta a las adiciones crecientes de los analitos objeto de estudio: el **TFA** y los aniones fluoruro y acetato. Para facilitar la lectura se representará de nuevo la respuesta del bloque precursor homólogo al CLP correspondiente. Para todas las valoraciones se utilizó una disolución *stock* en ACN de grado espectroscópico del CLP de 0.5 mg/mL, de la cual se tomaron 250 μ L y se añadieron a la cubeta de fluorescencia junto con 2.5 mL de ACN. La concentración final de CLP en la cubeta es, por tanto, de 0.05 mg/mL.

En primer lugar, se procedió a la valoración del polímero de referencia **CLP1** para confirmar que la adición de especies iónicas (protones, F^- ó AcO^-) no afecta a la fluorescencia de los polímeros en ausencia de grupos coordinantes (aminas ó ureas). Efectivamente, tras la adición de TFA, F^- ó AcO^- hasta una concentración de 350 μ M no se observó ningún cambio: los espectros de emisión y excitación del **CLP1**, para las diferentes adiciones de analito, eran totalmente superponibles.

A continuación, se evaluó la respuesta del **CLP2B** frente a la adición de un ácido orgánico, **TFA**. Comparando la respuesta de **CLP2B** frente a la que ofrecía su bloque precursor análogo, **BSP**, con unidades de piridina (**Figura 96**) se observa que hay una mejora sensible. La desactivación

de la fluorescencia para el **CLP2B** es superior al 50 % tras la adición de un exceso de **TFA**, mientras que la desactivación de la molécula **BSP** alcanza únicamente el 20 %, incluso empleando concentraciones de **TFA** superiores. En este caso se puede afirmar que el empleo del CLP ha mejorado la respuesta respecto al indicador fluorescente molecular.

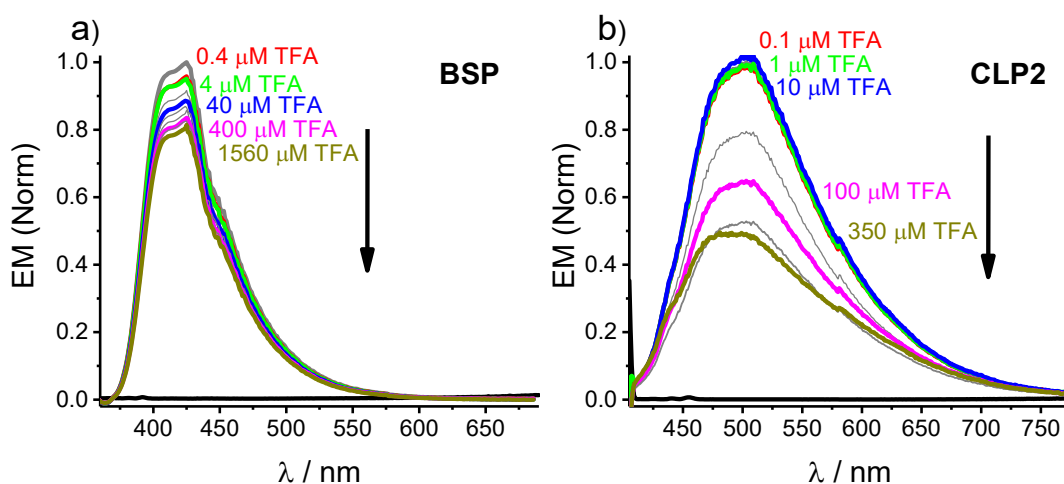


Figura 96. Comparación de la variación de la señal de fluorescencia frente a la adición del ác. TFA del a) bloque precursor BSP (3.9×10^{-6} M, λ_{exc} 350 nm) b) polímero CLP2 (0.05 mg/mL, λ_{exc} 400 nm) ambas en ACN.

En el capítulo 3 ya se describió que el bloque precursor **BSNet2** no presentaba respuesta alguna a la adición de **TFA**. A pesar de esto, se decidió preparar el polímero correspondiente **CLP3** con la esperanza de que la conjugación pudiese influir en las propiedades electrónicas del fluoróforo y, en este caso, la protonación del grupo dietilamino sí indujese un aumento en la emisión del **CLP3** (por inhibición de un potencial proceso de transferencia electrónica fotoinducida, PET). Desafortunadamente no fue así, y tras la adición de una concentración igual a 350 μM de **TFA**, no se observó ningún cambio en las propiedades espectroscópicas del polímero, siendo los espectros de emisión y excitación del **CLP3**, para las diferentes adiciones de analito, totalmente superponibles.

Finalmente, se evaluó el comportamiento de los CLPs derivados de urea **CLP4** y **CLP5**, realizando la comparación con los bloques precursores correspondientes: **BMSU** con cadenas polietoxiladas y **BDSU** sin sustituyentes en la cadena principal del polímero. En el caso del **CLP4** (**Figura 97**), se observa una respuesta significativa a la adición de acetato, hasta un 50 % de desactivación de la fluorescencia, alcanzando la saturación para una $c_{\text{AcO}^-} = 0.35$ mM, mientras que, como se describió en el capítulo 3, la molécula **BMSU** no respondía a la adición de AcO^- , incluso para una concentración de 0.8 mM. En el caso del anión fluoruro, la respuesta también se potencia para el CLP. Mientras que la adición de F^- ($c = 0.8$ mM) a una disolución de **BMSU**

en ACN causa una desactivación de la emisión del $\approx 30\%$, para el **CLP4**, la presencia de 0.35 mM F^- produce una disminución de la emisión del polímero de casi el 60%.

Hay que comentar que los cambios en el polímero parecen bastante bruscos, algo que puede deberse a un problema de difusión del acetato o fluoruro en la red del polímero. Se trata de polímeros másicos, poco porosos, donde la cinética de intercambio puede ser lenta.

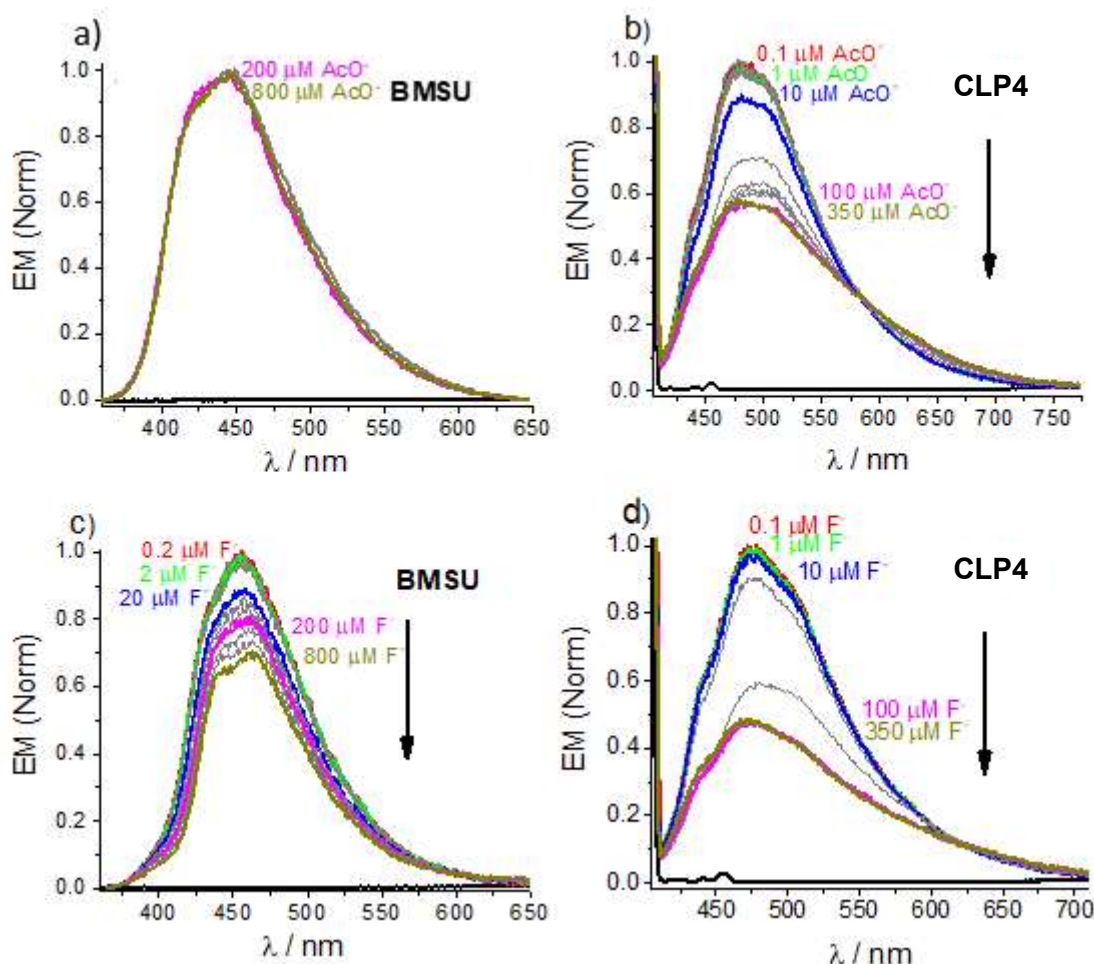


Figura 97. Comparación de la variación de la señal de fluorescencia del a) y c) del bloque precursor BMSU disuelto en ACN (2.1×10^{-6} M, λ_{exc} 350 nm) y del b) y d) del polímero CLP4 en suspensión en ACN (0.05 mg/mL, λ_{exc} 400 nm) frente a la adición de los aniones a) y b) acetato, c) y d) fluoruro.

En lo que respecta al **CLP5**, la respuesta frente acetato o fluoruro es similar o incluso algo inferior a lo que se obtenía con el bloque precursor análogo **BDSU** (Figura 98). Se alcanza una desactivación de fluorescencia de alrededor del 70-80 % en todos los casos a niveles de concentración similares (0.3-0.7 mM para alcanzar la saturación). La diferencia es que, en el caso del **CLP5**, no se observa la banda ancha a ~ 620 nm indicativa de un proceso ESPT cuando se añaden los aniones a elevadas concentraciones. Esto puede ser debido al hecho de que, en el

entorno hidrofóbico del polímero, no se ve favorecida la formación de un estado excitado tan polar, con separación de cargas, como el que se genera por una transferencia protónica.

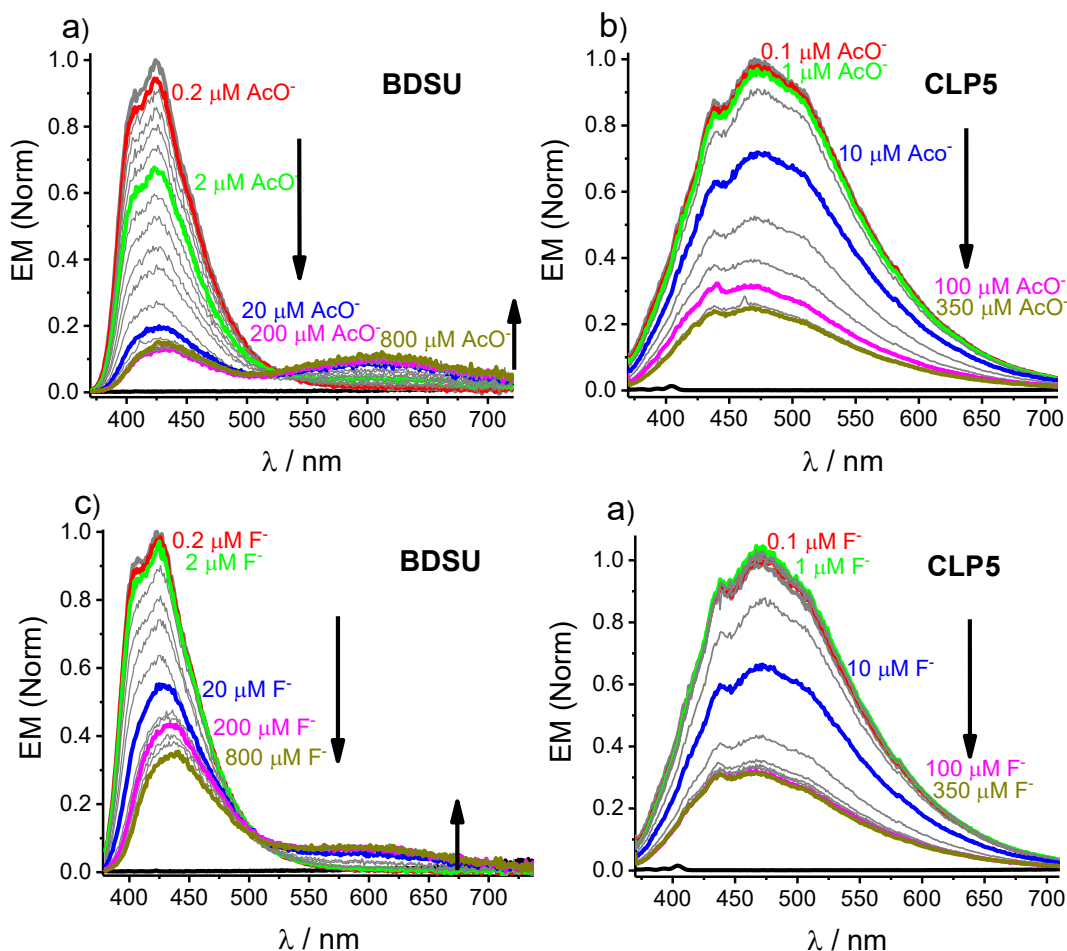


Figura 98. Comparación de la variación de la señal de fluorescencia del a) y c) del bloque precursor BDSU disuelto en ACN (1.8×10^{-6} M, λ_{exc} 373 nm) y del b) y d) del polímero CLP5 en suspensión en ACN (0.05 mg/mL, λ_{exc} 360 nm) frente a la adición de los aniones a) y b) anión carboxilato, c) y d) anión fluoruro.

En resumen, en algunos casos como en los polímeros **CLP2B** y **CLP3** sí parece que ha habido una mejora de la respuesta con respecto a las unidades monoméricas individuales. En otros casos, como el discutido para el **CLP5**, la respuesta del polímero es similar a la del bloque precursor correspondiente, con la diferencia que en el material se inhibe la formación de estados excitados con separación de carga debido al carácter apolar de la matriz.

Al igual que en el caso de los bloques precursores **BMSU** vs. **BDSU** sí se reproduce el hecho de que la introducción de cadenas laterales de carácter electrodonadoras (**CLP4**) inhibe la respuesta con respecto al mismo polímero sin sustituyentes (**CLP5**). Desafortunadamente, la obtención del CLP análogo a **BPSU** con grupos $-\text{COOMe}$ electroattractores no fue posible por problemas en la síntesis.

Cabe añadir que, pese al importante número de polímeros conjugados fluorescentes que se describen en bibliografía con aplicaciones en el campo de los sensores,^{2,44-53} pocos son los polímeros conjugados que incorporan unidades urea en sus cadenas laterales⁵⁴⁻⁵⁵ o directamente a sus esqueletos para emplear sus propiedades ópticas y de reconocimiento en la elaboración de sensores.⁵⁶⁻⁵⁷ Siendo la urea, como ya se explicó en el capítulo anterior, uno de los grupos más empleados, no sólo a la hora de diseñar sondas moleculares para el reconocimiento de oxoaniones, sino también en la síntesis de MIPs no conjugados (incluso en nuestro grupo de investigación), resulta extraño encontrar tan poca bibliografía sobre el tema, pudiendo atribuir este hecho a la dificultad de la síntesis de este tipo de materiales (CLPs entrecruzados).

Con carácter previo a la síntesis de los CLPs entrecruzados, habría sido de gran interés y ayuda la preparación de CLPs *lineales* y solubles, para poder llevar a cabo una caracterización de las cadenas poliméricas a través de RMN o cromatografía por permeación en gel (GPC, un tipo de cromatografía de exclusión por tamaño), para la medición del peso molecular, tamaño y estructura del polímero. Pese a que la introducción del entrecruzante modifica la reactividad en la polimerización, así como sus propiedades morfológicas y ópticas, ello podría haber ayudado a discernir si la baja respuesta de alguno de los CLPs aquí sintetizados, se debió al formato (polímero en masa y molturación de este) en el que se obtuvo. Lamentablemente la falta de tiempo no lo permitió.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Anguera, G.; Sánchez-García, D., Conjugated polymers: synthesis and applications in optoelectronics, *Afinidad*, **2014**, 71 (568), 251-262.
2. Alvarez, A.; Costa-Fernández, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A.; Salinas-Castillo, A., Fluorescent conjugated polymers for chemical and biochemical sensing, *Trac-Trends Anal. Chem.*, **2011**, 30 (9), 1513-1525.
3. Svoboda, J.; Bláha, M.; Sedláček, J.; Vohlídal, J.; Balcar, H.; Mav-Golež, I.; Žigon, M., New Approaches to the synthesis of pure conjugated polymers, *Acta Chim. Slov.*, **2006**, 53 (4), 407-416.
4. Reynolds, J. R., Synthesis and classes of conjugated polymers. In *Conjugated polymers: a practical guide to synthesis*, Müllen, K, Reynolds, J. R., Masuda, T., Eds., RSC publishing: UK, **2014**, 79-102.
5. a) Zhao, Y.; Campbell, K.; Tykwinski, R. R., Iterative synthesis and characterization of cross-conjugated iso-polydiacetylenes, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67 (2), 336-344. b) Wudl, F.; Bitler, S. P., Synthesis and some properties of poly(diacetylene) (polyenyne) oligomers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108 (15), 4685-4687.
6. Zheng, T.; Schneider, A. M.; Yu, L., Stille Polycondensation: A Versatile Synthetic Approach to Functional Polymers. In *Synthetic Methods for Conjugated Polymer and Carbon Materials*, Leclerc, M.; Morin, J. F., Eds., Wiley: Germany, **2017**, 1-58.
7. Rehahn, M.; Schlüter, A.-D.; Wegner, G.; Feast, W. J., Soluble poly(para-phenylene)s. 1. Extension of the Yamamoto synthesis to dibromobenzenes substituted with flexible side chains, *Polymer*, **1989**, 30 (6), 1054-1059.
8. Bochmann, M.; Kelly, K., Palladium catalysed cross-coupling reactions with difunctional tin reagents: a general route to aromatic polymers, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1989**, (9), 532-534.
9. Cheng, Y.-J.; Yang, S.-H.; Hsu, C.-S., Synthesis of conjugated polymers for organic solar cell applications, *Chem. Rev.*, **2009**, 109 (11), 5868-5923.
10. Xu, S.; Kim, E. H.; Wei, A.; Negishi, E.-i., Pd- and Ni-catalyzed cross-coupling reactions in the synthesis of organic electronic materials, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **2014**, 15 (4), 044201.
11. Leclerc, M.; Morin, J. F., Synthetic methods for conjugated polymer and carbon materials, Wiley: Germany, **2017**.
12. Krishna, A.; Lunchev, A. V.; Grimsdale, A. C., Suzuki polycondensation. In *Synthetic methods for conjugated polymer and carbon materials*, Leclerc, M.; Morin, J. F., Eds., Wiley: Germany, **2017**, 59-96.

13. Miyaura, N., Metal-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds with organic halides. In *Metal-catalyzed cross-coupling reactions*, Mejiere, A.; Diederich, F., Eds., Wiley: Germany, **2008**, 41-123.
14. Sakamoto, J.; Rehahn, M.; Schlüter, A. D., Suzuki polycondensation: a powerful tool for polyarylene synthesis. In *Design and synthesis of conjugated polymers*, Leclerc, M.; Morin, J. F., Eds., Wiley: Germany, **2010**, 45-90.
15. Littke, A. F.; Fu, G. C., A convenient and general method for Pd-catalyzed Suzuki cross-couplings of aryl chlorides and arylboronic acids, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **1998**, 37 (24), 3387-3388.
16. Zapf, A.; Ehrentraut, A.; Beller, M., A new highly efficient catalyst system for the coupling of nonactivated and deactivated aryl chlorides with arylboronic acids, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2000**, 39 (22), 4153-4155.
17. Amatore, C.; Jutand, A., Anionic Pd(0) and Pd(II) intermediates in Palladium-catalyzed Heck and cross-coupling reactions, *Accounts Chem. Res.*, **2000**, 33 (5), 314-321.
18. Bo, Z.; Schlüter, A. D., Entering a new level of use for Suzuki cross-coupling: poly(para-phenylene)s with fourth-generation dendrons, *Chem.-Eur. J.*, **2000**, 6 (17), 3235-3241.
19. Barder, T. E.; Walker, S. D.; Martinelli, J. R.; Buchwald, S. L., Catalysts for Suzuki-Miyaura coupling processes: scope and studies of the effect of ligand structure, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (13), 4685-4696.
20. Maria, C. M.-B.; Fernando, N.-V.; Elena, B.-P.; Javier, L. U., Molecularly imprinted polymers as selective recognition elements in optical sensing, *Curr. Anal. Chem.*, **2008**, 4 (4), 316-340.
21. Li, J.; Kendig, C. E.; Nesterov, E. E., Chemosensory performance of molecularly imprinted fluorescent conjugated polymer materials, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129 (51), 15911-15918.
22. Liu, R.; Cui, Q.; Wang, C.; Wang, X.; Yang, Y.; Li, L., Preparation of sialic acid-imprinted fluorescent conjugated nanoparticles and their application for targeted cancer cell imaging, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9 (3), 3006-3015.
23. Zhang, W.; Kang, J.; Li, P.; Liu, L.; Wang, H.; Tang, B., Two-photon fluorescence imaging of sialylated glycans in vivo based on a sialic acid imprinted conjugated polymer nanoprobe, *Chem. Commun.*, **2016**, 52 (97), 13991-13994.
24. Wang, Y.; Euler, W. B.; Lucht, B. L., Unusual chromic and doping behavior of ether substituted polythiophenes, *Chem. Commun.*, **2004**, (6), 686-687.
25. Lipshutz, B. H.; Keil, R.; Eiisworth, E. L., A new method for the in situ generation of Cp2Zr(H)Cl (Schwartz' Reagent), *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31 (50), 7257-7260.

26. Pereira, S.; Srebnik, M., Hydroboration of alkynes with pinacolborane catalyzed by HZrCp₂Cl, *Organometallics*, **1995**, *14* (7), 3127-3128.
27. Tucker, C. E.; Davidson, J.; Knochel, P., Mild and stereoselective hydroborations of functionalized alkynes and alkenes using pinacolborane, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57* (12), 3482-3485.
28. Pereira, S.; Srebnik, M., A study of hydroboration of alkenes and alkynes with pinacolborane catalyzed by transition metals, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37* (19), 3283-3286.
29. Keglevich, G., Milestones in Microwave Chemistry. *Springer*: Switzerland, **2016**.
30. Ho, H. E.; Asao, N.; Yamamoto, Y.; Jin, T., Carboxylic acid-catalyzed highly efficient and selective hydroboration of alkynes with pinacolborane, *Org. Lett.*, **2014**, *16* (17), 4670-4673.
31. Fleige, M.; Möbus, J.; vom Stein, T.; Glorius, F.; Stephan, D. W., Lewis acid catalysis: catalytic hydroboration of alkynes initiated by Piers' borane, *Chem. Commun.*, **2016**, *52* (72), 10830-10833.
32. Nakajima, K.; Kato, T.; Nishibayashi, Y., Hydroboration of alkynes catalyzed by pyrrolide-based PNP pincer-iron complexes, *Org. Lett.*, **2017**, *19* (16), 4323-4326.
33. Ang, N. W. J.; Buettner, C. S.; Docherty, S.; Bismuto, A.; Carney, J. R.; Docherty, J. H.; Cowley, M. J.; Thomas, S. P., Borane-catalysed hydroboration of alkynes and alkenes, *Synthesis* **2018**, *50* (04), 803-808.
34. Pecher, J.; Mecking, S., Nanoparticles of conjugated polymers, *Chem. Rev.*, **2010**, *110* (10), 6260-6279.
35. Hittinger, E.; Kokil, A.; Weder, C., Synthesis and characterization of cross-linked conjugated polymer milli-, micro-, and nanoparticles, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2004**, *43* (14), 1808-1811.
36. Fairlamb, I. J. S.; Kapdi, A. R.; Lee, A. F., η^2 -dba complexes of Pd(0): the substituent effect in Suzuki-Miyaura coupling, *Org. Lett.*, **2004**, *6* (24), 4435-4438.
37. Littke, A. F.; Dai, C.; Fu, G. C., Versatile catalysts for the Suzuki cross-coupling of arylboronic acids with aryl and vinyl halides and triflates under mild conditions, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122* (17), 4020-4028.
38. Ohe, T.; Miyaura, N.; Suzuki, A., Palladium-catalyzed cross-coupling reaction of organoboron compounds with organic triflates, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58* (8), 2201-2208.
39. Nagai, A.; Chujo, Y., Aromatic ring-fused BODIPY-based conjugated polymers exhibiting narrow near-infrared emission bands, *Macromolecules*, **2010**, *43* (1), 193-200.
40. Zhang, Z.; Xu, B.; Su, J.; Shen, L.; Xie, Y.; Tian, H., Color-tunable solid-state emission of 2,2'-biindenyl-based fluorophores, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **2011**, *50* (49), 11654-11657.

41. Usta, H.; Yilmaz, M. D.; Avestro, A.-J.; Boudinet, D.; Denti, M.; Zhao, W.; Stoddart, J. F.; Facchetti, A., BODIPY–thiophene copolymers as p-channel semiconductors for organic thin-film transistors, *Adv. Mater.*, **2013**, 25 (31), 4327-4334.
42. Liao, Y.; Yang, G.-C.; Feng, J.-K.; Shi, L.-L.; Yang, S.-Y.; Yang, L.; Ren, A.-M., Theoretical study on the optoelectronic properties of electron-withdrawing substituted fiethynylfluorenyl Gold(I) complexes, *J. Phys. Chem. A*, **2006**, 110 (48), 13036-13044.
43. Hu, Z.; Willard, A. P.; Ono, R. J.; Bielawski, C. W.; Rossky, P. J.; Vanden Bout, D. A., An insight into non-emissive excited states in conjugated polymers, *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 8246.
44. Mako, T. L.; Racicot, J. M.; Levine, M., Suparmolecular luminiscent sensor, *Chem. Rev.* **2019**, 119, 322–477.
45. Kim, S. F.; Ren, G.; Jeneke, S. A., One-dimensional nanostructures of π -conjugated molecular systems: assembly, properties, and applications from photovoltaics, sensors, and nanophotonics to nanoelectronics, *Chem. Mater.*, **2011**, 23, 682-732.
46. McQuade, D. T.; Pullen, A. E.; Swager, T. M.; Conjugated polymer-based chemical sensors, *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 2537-2574.
47. Thomas III, S. W.; Joly, G. D.; Swager, T. M., Chemical sensors based on amplifying fluorescent conjugated polymers, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 1339-1386.
48. Pecher, J.; Mecking, S., Nanoparticles of conjugated polymers, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 6260-6279.
49. Kim, H.; Kim, Y., Chnag, J. Y.; Polymers for luminescent sensing applications, *Macromol. Chem. Phys.*, **2014**, 215, 1274-1285.
50. Fan, L. J.; Zhng, Y.; Murphy, C. B.; Angell, S. E.; Parker, M. F. L.; Flynn, B. R.; Jones Jr., W. E., Fluorescent conjugated polymer molecular wire chemosensors for transition metal ion recognition and signaling, *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, 253, 410-422.
51. Tuncel, D.; Demir, H. V., Conjugatd polymer nanoparticles, *Nanoscale*, **2010**, 2, 484–494.
52. Li, K.; Liu, B., Polymer encapsulated conjugated polymer nanoparticles for fluorescence bioimaging, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 1257-1264.
53. Lee, K.; Povlich, L. K.; Kim, J., Recent advances in fluorescent and colorimetric conjugated polymer-based biosensors, *Analyst*, **2010**, 135, 2179–2189.
54. Sakai, R., Conjugated polymers applicable to colorimetric and fluorescent anion detection, *Polym. J.*, **2016**, 48, 59-65.
55. Sakai, R.; Nagai, A.; Tago, Y.; Sato, S.; Nishimura, Y.; Arai, T.; Satoh, T.; Kakuchi, T., Fluorescence turn-on sensing of anions based on disassembly process of urea-functionalized poly(phenylenebutadiynylene) aggregates, *Macromolecules*, **2012**, 45, 4122–4127.

56. Charron, B. P.; Ocheje, M. U.; Selivanova, M.; Hendsbee, A.; Li, Y.; Rondeau-Gagné, S., Electronic properties of isoindigo-based conjugated polymers bearing urea-containing and linear alkyl lide chains, *J. Mater. Chem. C*, **2018**, 6 (44), 12070-12078.
57. Shao, B.; Zhu, X.; Plunkett, K. N.; Vanden-Bout, D. A., *Polym. Chem.*, **2017**, 8 (7), 1188-1195.
58. Urraca, J. L.; Huertas-Pérez, J. F.; Cazorla, G. A.; Gracia-Mora, J., García-Campaña, A. M.; Moreno-Bondi, M. C., Development of magnetic MIP for selective extraction: determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection. Urraca et. al *Ana. Bional. Chem.*, **2016**, 11, 3033-42.
59. Wan, W.; Biyikal, M.; Wagner, R.; Sellergren, B.; Rurack, K., Fluorescent sensory microparticles that “light-up” consistin of a sílica core and a MIP Shell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1-6

Capítulo 5: Parte experimental

1. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN.....	197
2. SÍNTESIS DE SUCEDÁNEOS DE MICOTOXINAS.....	200
2.1. Sucedáneo de la Fumonisina B1.....	200
2.2. Sucedáneo de la citrinina	203
3. SÍNTESIS DE ELEMENTOS PRECURSORES DE CLPs.....	205
3.1. Elementos precursores para la detección de ácidos.....	205
3.2. Elementos precursores para la detección del anión carboxilato.....	208
4. SÍNTESIS DE CLPs	221
4.1. Síntesis de monómeros	221
4.2. Síntesis de polímeros	230
CONCLUSIONES	237
CONCLUSIONS	243
ANEXO I: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	249
Derivados de micotoxinas	249
Elementos precursores de CLPs	259
Monómeros de CLPs	280

1. **MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN**

Los **reactivos y disolventes** utilizados en esta tesis se compraron como productos comerciales de alta calidad de proveedores industriales (Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fluorochem, Scharlab, Alfa Aesar, Panreac Quimica, Fisher Scientific, Thermo Scientific, Lumiprobe, AccesPharma, TCI Europe) y utilizados tal como se recibieron, a menos que se indique lo contrario. Los anticuerpos fueron suministrados por Jackson ImmunoResearch. La micotoxina fumonisina B1 pertenecía a Fermentek Ltd. El diclorometano anhidro se obtuvo por destilación simple con hidruro de calcio. El agua se purificó con un Sistema Direct-Q3-UV (Merck Millipore).

La **cromatografía analítica de capa fina** (CCF) se llevó a cabo en placas de aluminio para TLC de Merck Kieselgel F254, gel de sílice recubierto con indicador fluorescente F254. La detección se realizó con luz UV ($\lambda = 254$ o 365nm), vapor I_2 , ninhidrina (1 g / 100 mL de EtOH) y verde de bromocresol (disolviendo 0.04 g de verde de bromocresol en 100 ml de etanol absoluto. Luego se añadió gota a gota una solución 0.1 M de NaOH acuoso hasta que la solución se volvió azul).

La **cromatografía flash en columna** (CFC) se realizó utilizando gel de sílice de Scharlab, 60 \AA , $40\text{--}60\text{ }\mu\text{m}$.

Reactor microondas (MW). Durante la presente Tesis se emplearon dos reactores microondas diferentes: un Biotage® Initiator+ y un 850-W Anton Paar 200. El rango de temperaturas empleado fue de $40\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$, utilizando un gradiente de temperatura típico de $2\text{--}5\text{ }^\circ\text{C/s}$ dependiendo del disolvente. La mayoría de las reacciones no precisaron tiempos superiores a 90 min. Para el Biotage® el rango de presión se encontraba dentro de los $0\text{--}302\text{ bar}$ (3 MPa ; 435 psi), rango de potencia $0\text{--}400\text{ W}$ proporcionado por un magnetrón a 2.45 GHz . Para el Anton la presión máxima se reduce a los 200 bar y la potencia máxima es de 850 W . Ambos disponían de viales para volúmenes de 2 a 10 mL y de 10 a 30 mL . Variable de agitación magnética: agitador magnético ($300\text{--}900\text{ rpm}$). Ambos microondas estaban equipados con un suministro de aire a presión de refrigeración: $> 60\text{ L/min}$.

Los espectros de **resonancia magnética nuclear** (RMN) se llevaron a cabo en el centro de ayuda a la investigación (CAI) de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico de la UCM, utilizando los equipos Bruker Avance III 700 MHz (^1H , 700 MHz ; ^{13}C , 175 MHz), o Bruker DPX 300 MHz (^1H , 300 MHz ; ^{13}C , 75 MHz). Para el procesamiento de los espectros se utilizó el software “MestReNova-9.0.1-13254” referenciándose a la señal del disolvente que el mismo programa indica. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) en relación con el tetrametilsilano interno; Las constantes de acoplamiento (J) están en hercios (Hz). Las

abreviaciones utilizadas para describir la multiplicidad de las señales se encuentran en el apartado abreviaturas y símbolos al principio de la Tesis.

La **espectrometría de masas** (MS) se llevó a cabo en el CAI de Espectrometría de Masas de la UCM. Utilizando los equipos siguientes: espectrómetro de Masas de Tiempo de Vuelo MALDI-TOF/TOF Bruker modelo ULTRAFLEX (MALDI), espectrómetro de Masas de trampa de iones Bruker modelo HCT Ultra (ESI) y espectrómetro de Masas de Alta Resolución (HRMS) FTMS Bruker modelo APEX Q IV.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (**SEM**) se obtuvieron empleando un JEOL JEM 2100 (200 kV) en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME).

Los espectros de **absorción UV-Vis** se registraron en un Varian Cary 3-Bio de doble haz. Se emplearon los siguientes parámetros:

- Rango: de 250 nm a 800 nm (salvo en casos puntuales).
- Tiempo de integración: 0.10 s.
- Intervalo de lectura: 1.00 nm.
- Velocidad de barrido: 600.0 nm/min.
- Ancho de rendija: 2 nm.
- Modo de haz: doble haz

Para los espectros de **emisión y excitación** se empleó un espectrofluorómetro FluoroSENS spectrofluorometer (Gilden Photonics) con las siguientes especificaciones (en ningún momento se empleó ningún filtro o polarizador):

- Lámpara de arco de xenón de 150 W.
- Detector: Hamamatsu R1527.
- Fotodiodo de referencia: Hamamatsu UV100-L.
- Geometría: 90°.
- Doble monocromador en los canales de emisión y excitación:
 - a) Rejilla de excitación: tallada @ 300 nm, 1200 g/mm. Eficiencia de pico >60%.
 - b) Rejilla de emisión: tallada @ 500 nm, 1200 g/mm. Eficiencia de pico >60%.

En todos los casos: Intervalo de lectura: 1 nm; Número de exploraciones: 1; Tiempo de integración espectro emisión / excitación: 200 ms / 100 ms.

Rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_f). Los valores de Φ_f se determinaron mediante el método relativo empleando diferentes estándares. La metodología seguida se encuentra descrita en el apéndice de esta Tesis.

Para la realización del **bioensayo competitivo por fluorescencia**, se empleó una placa de 96 micropocillos (PACKARD HTRF 96) y un lector de fluorescencia para microplacas CLARIOstar de BMG-Labtech. En primer lugar se prepararon las nanopartículas de oro conjugadas con la proteína G (NPAu-proteína G), para ello se mezclaron 378 μL de nanopartículas de oro (NPAu 17 nm) con 65 μL de la proteína G y 57 μL de un tampón fosfato 10 mM (pH 8.0) que contenía 0.1% (p/v) de BSA (albúmina de suero bovino) y se incubó durante 45 min a +4 °C. Tras este tiempo la mezcla se centrifugó a 13400 rpm, se eliminó el sobrenadante. De forma experimental se observó que con dos lavados eran suficiente para eliminar el exceso de proteína G. Finalmente las partículas se suspendieron en 50 μL de la disolución tampón, obteniendo así una disolución stock 25 nM de NPAu. La concentración de NPAu se determinó a partir de los espectros UV-vis utilizando los coeficientes de absorción descritos en bibliografía a 450 nm para NPAu de diferentes tamaños. Manteniendo un volumen constante de 60 μL en cada pocillo, las concentraciones finales de anticuerpo anti-FB1, MMTP-YFP (determinada experimentalmente empleando un kit comercial BCA siguiendo las especificaciones del fabricante) y NPAu-proteínaG cada pocillo se ajustaron a 1.5 $\mu\text{g/mL}$, anti-FB1, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y 1 nM respectivamente, variando únicamente la concentración final de los analitos (entre 0.4–425 nM para FB₁ y 1.7–1735 μM para Sur-FumFB1). Se realizó, un triplicado para cada medida. La muestra se excitó a 500 nm recogiendo la intensidad de emisión a 545 nm.

La **espectroscopia de absorción transitoria de UV-Vis de femtosegundo (TAS)** se realizó en un espectrómetro cinético láser personalizado por el grupo de investigación LASIR en la Universidad de Lille. Su resolución temporal y sensibilidad son de ≈ 200 fs y $\approx 10^{-4}$ OD, respectivamente. La configuración para estos experimentos fue la siguiente: un amplificador laser de Ti:Zafiro (Coherent Mira 900, 1 W, 1 kHz, ≈ 90 fs ancho del pulso, B.M. Industries) acoplado a un amplificador paramétrico óptico (OPA, Quantronix Palitra-FS-UV3), con una fuente de excitación modulable entre 260 nm y 2000 nm, un haz de luz blanca generado al enfocar el pulso láser en una placa giratoria de CaF₂ de 1 mm, y una CCD (Princeton Instrument, LN/ CCD-1340/400-EB con un controlador ST-138) para monitorizar la absorción transitoria en el intervalo 300 nm – 1100 nm. El retraso en el tiempo de los pulsos se consigue con una línea de retardo óptico (Microcontrol Model MT160-250PP, dirigido por un controlador ITL09, precisión 0.1 μm). Las muestras se hicieron circular en una celda de flujo cuyo grosor de la ventana de entrada es de 200 μm y una longitud de trayectoria óptica de 2 mm. Los espectros de absorción *pump-probe* se acumularon durante unos 3 minutos (mínimo 100000 secuencias de *pump-probe*).

Las medidas de **tiempo de vida de fluorescencia con resolución ps** se llevaron a cabo mediante medidas de conteo de fotón único (Single Photon Timing, SPT) utilizando un oscilador de Ti:Zafiro (Coherent Chameleon Ultra II, 80 MHz, 200 fs, 3.6 W, 840 nm) acoplado a un OPA (Quantronix Palitra-FS-UV3). La adquisición de la señal de fluorescencia se realizó mediante un espectrómetro PicoQuant FT200. La longitud de onda de emisión se seleccionó con un monocromador tipo Czerny-Turner equipado con rendijas de 0.5 mm que proporcionan una resolución espectral de 4 nm. La fluorescencia se detectó con un tubo fotomultiplicador de placa de microcanal (Hamamatsu R3809U) y se registró con un sistema PicoHarp 300 TCSPC Detector, este mismo programa se utilizó para el posterior análisis de resultados.

2. SÍNTESIS DE SUCEDÁNEOS DE MICOTOXINAS

2.1. Sucedáneo de la Fumonisina B1

Síntesis del ácido propano-1,2,3-tricarbóxico (1,2-anhidro) (2.2)

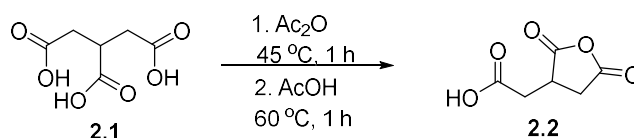


Figura 99. Ciclación del ácido tricarbalílico.

3 g (17 mmol) de ácido tricarbalílico (**2.1**) se disolvieron en 3.7 mL de anhidro acético (Ac₂O) (39 mmol) en un matraz de 25 mL de dos bocas provisto de un refrigerante. La mezcla de reacción se calentó a 45 °C con agitación continua durante una hora. Sobre la mezcla de reacción se añadieron 3.7 mL (65 mmol) de ácido acético (AcOH), se subió la temperatura a 60 °C y se dejó reaccionar una hora más. El exceso de disolventes se llevó a sequedad bajo presión reducida. El crudo de reacción se cristalizó empleando AcOEt, obteniéndose un sólido blanco (2.6 g, 87%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CO), δ/ppm: 3.60 (m, 1H, COCHCH₂) 3.25 (m, 1H, COCHHCH), 2.99 (m, 3H, COCH₂CHCHHCO).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃CO), δ/ppm: 175.38 (C=O), 172.74 (C=O), 171.88 (C=O), 37.40 (COOHCH₂), 34.55 (CH), 34.08 (CH₂).

Síntesis del anhído 1-(cloroformil)propano-2,3-dicarboxílico (2.3)

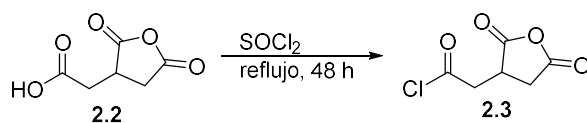


Figura 100. Activación del ác. carboxílico con cloruro de tionilo.

3 g (19 mmol) de ácido propano-1,2,3-tricarboxílico(1,2-anhído) (**2.2**) se disolvieron en 138 mL (1.9 mol) de cloruro de tionilo (SOCl_2) en un matraz de 250 mL de dos bocas provisto de un refrigerante y se dejó a reflujo durante 48 h. El exceso de SOCl_2 se eliminó por destilación a vacío obteniendo un producto blanco ligeramente amarronado (80%).

^1H -RMN (300 MHz, CD_3CO), δ/ppm : 3.85 (m, 1H, COCHCH_2) 3.72 (m, 2H, ClCOCH_2CH), 3.32 (dd, $J = 10.03$ Hz, $J = 8.60$ Hz, 1H, COCHHCH), 3.07 (dd, $J = 11.44$ Hz, $J = 7.23$ Hz, 1H, COCHHCH).

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3CO), δ/ppm : 174.69(C=O), 174.00 (C=O), 173.36 (C=O), 47.04 (ClCOCH_2), 38.34 (CH), 34.26 (CH_2).

Síntesis del N,N'-(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahidrofuran-3-il)-N-etilacetamida) (2.4)

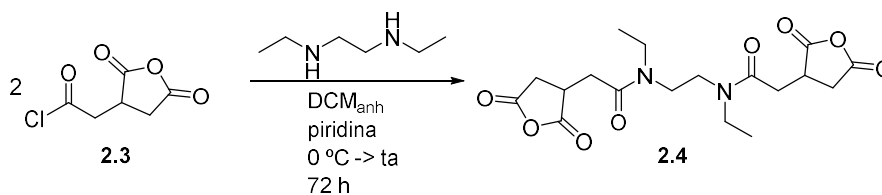


Figura 101. Formación de la doble acetamida 2.4.

En un matraz de 250 mL se añadieron 1.5 g (8.5 mmol) de anhído 1-(cloroformil)propano-2,3-dicarboxílico (**2.3**), el sistema se purgó con argón y se puso en un baño de hielo. El reactivo se disolvió en DCM_{anh} (100 mL) enfriado previamente en un baño de hielo. Seguidamente se añadió gota a gota una disolución en DCM_{anh} (15 mL) formada por 0.49 mL (3.4 mmol) de N,N'-dietiletilendiamina y 0.68 mL (8.5 mmol) de piridina. La reacción se dejó a temperatura ambiente y con agitación continua durante 72 h. Transcurridas las 72 h se realizaron varios lavados con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl. La fase

orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente bajo presión reducida, obteniendo un sólido pulverulento marrón (0.89, 67%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃CO), δ/ppm: 3.68-2.72 (ma, 18H), 1.41-1.00 (ma, 6H, 2xCH₃CH₂N)

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃CO), δ/ppm: 175.24 (C=O), 171.70 (C=O), 169.63 (C=O), 42.34, 41.73, 36.93, 34.01, 33.00, 13.01 (CH₃).

MS-ESI⁺ (CH₃OH): m/z [M+Na]⁺ calculado para C₁₈H₂₄N₂O₈Na⁺ 419.1 encontrado 419.1.

Síntesis del ácido 2,2'-((etano-1,2-diilbis(etilazanedil))bis(2-oxoetano-2,1-diol))disuccinico (Mim-FumB₁)

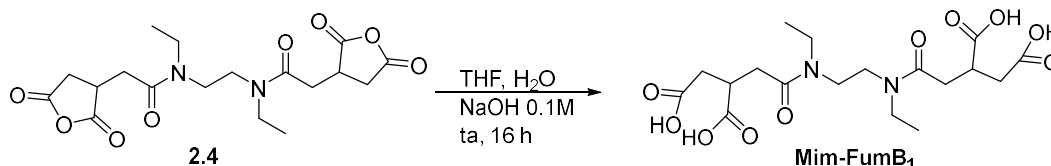


Figura 102. Apertura de los anhidros en medio básico.

En un matraz de 250 ml se disolvieron 0.35 g (0.88 mmol) de **2.4** en 25 mL de THF. Seguidamente se añadieron 175 mL de una disolución acuosa 0.1 M de NaOH. Transcurridas 16 horas la reacción se neutralizó con HCl 1 M y se evaporó el disolvente con rotación a presión reducida. Para asegurar la eliminación completa de agua se dejó el sólido marrón brillante durante una noche en una estufa de alto vacío a 45 °C, obteniéndose 0.37 g (99%) de producto.

¹H-RMN (300 MHz, D₂O), δ/ppm: 3.48 (m, 8H, 2xCH₃CH₂NCH₂), 3.00 (m, 2H, CH), 2.75 (m, 2H, COOHCH₂) 2.54 (m, 4H, COOHCH₂CHCH₂), 2.25 (m, 2H, COOHCH₂) 1.23 (m, 3H, CH₃) 1.12 (m, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, D₂O), δ/ppm: 183.02 (COOH), 180.87 (COOH), 174.18 (C=O), 43.97, 43.58, 42.51, 40.48, 35.14, 13.09 (CH₃).

MS-ESI⁺ (H₂O): m/z [M+Na]⁺ calculado para C₁₈H₂₈N₂O₁₀Na⁺ 455.2 encontrado 455.2.

2.2. Sucesdáneo de la citrinina

Síntesis del ácido 4-(5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)pentanamido)-2-hidroxybenzoico (2.7)

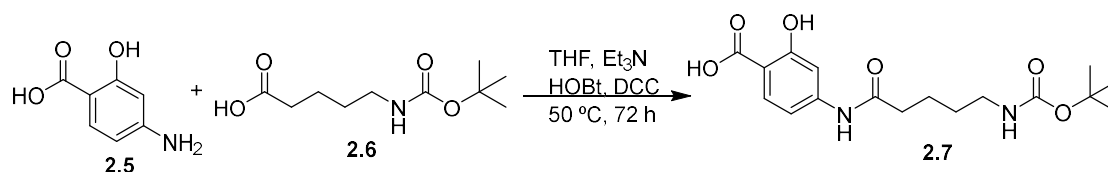


Figura 103. Formación de la amida 2.7 activando el ácido 2.6 con DCC y HOBT.

En un matraz de dos bocas de 50 mL provisto de un refrigerante se introdujeron 0.5 g (2.3 mmol) de ácido 5-(BOC-amino)pentanoico (**2.6**), 1.1 g (6.9 mmol) de HOBT y 1.4 (6.9 mmol) de DCC y el sistema se purgó con argón. Se añadieron 24 mL de THF (24 mL) y 0.7 mL (6.9 mmol) de Et₃N. Transcurridos 30 min se observó la aparición de un precipitado blanco, debido a la formación de la dicitclohexilurea que se forma al activar el ácido. Se procedió a calentar la reacción a 50 °C y se añadieron 0.32 g (2.3 mmol) de ácido 4-aminosalicílico (**2.5**) disueltos en 6 ml de THF. La reacción se dejó con agitación continua durante 72 h. El precipitado se eliminó con un filtro de pliegues y la disolución transparente se lavó primero con una disolución acuosa de AcOH al 10%, seguida de un lavado con una disolución acuosa de NaOH al 10%. La fase orgánica se descartó y la fase acuosa se llevó a pH ácido con HCl 3 M formándose un precipitado ligeramente marrón. El precipitado formado se recuperó mediante filtración a vacío (0.37 g, 50%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃DO), δ/ppm: 7.76 (d, *J* = 8.68 Hz, 1H, COOHCH), 7.32 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H, COHCHCNH), 7.02 (dd, *J* = 8.68 Hz, *J* = 2.05 Hz, 1H), 3.07 (t, *J* = 6.83 Hz, CH₂CH₂NH), 2.40 (t, *J* = 7.35 Hz, CONHCH₂CH₂), 1.70 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 1.53 (m, 2H, CONHCH₂CH₂), 1.43 (s, 9H, CCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃DO), δ/ppm: 174.43, 164.42, 163.91, 158.43, 146.42, 132.20, 111.43, 109.31, 107.50, 79.51 (C(CH₃)₃), 40.59 (CONHCH₂), 37.28 (CONHCH₂), 28.88 (CCH₃), 28.85 (CH₂CH₂NH), 24.00 (NHCOCH₂CH₂).

Síntesis de la sal 5-((4-carboxi-3-hidroxifenil)amino)-5-oxopentan-1-amonio de trifluoroacetato (AVA-ASA)



Figura 104. Eliminación en medio ácido del grupo *tert*-butilo de 2.7.

0.291 g (0.83 mmol) de **2.7** se disolvieron en una mezcla DCM/MeOH 9:1 (10 mL) en un matraz de 50 mL. Se añadieron 10 mL de TFA (la misma cantidad que de la mezcla de disolventes) y se dejó la reacción con agitación continua a temperatura ambiente durante una hora. Finalmente se eliminó el disolvente a presión reducida obteniendo un precipitado ligeramente marrón (0.302 g, 99%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃DO), δ/ppm: 7.76 (d, *J* = 8.68 Hz, 1H, COOHCH), 7.35 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H, COHCHCNH), 7.00 (dd, *J* = 8.67 Hz, *J* = 2.06 Hz, 1H), 2.96 (t, *J* = 6.76 Hz, CH₂CH₂NH), 2.50 (t, *J* = 6.69 Hz, CONHCH₂CH₂), 1.74 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃DO), δ/ppm: 174.01, 173.06, 164.14, 146.37, 132.22, 111.49, 109.34, 107.90, 40.42 (CH₂CH₂NH), 36.93 (NHCOCH₂CH₂), 28.04 (CH₂CH₂NH), 23.05 (NHCOCH₂CH₂).

Síntesis del BODIPY-AVA-ASA

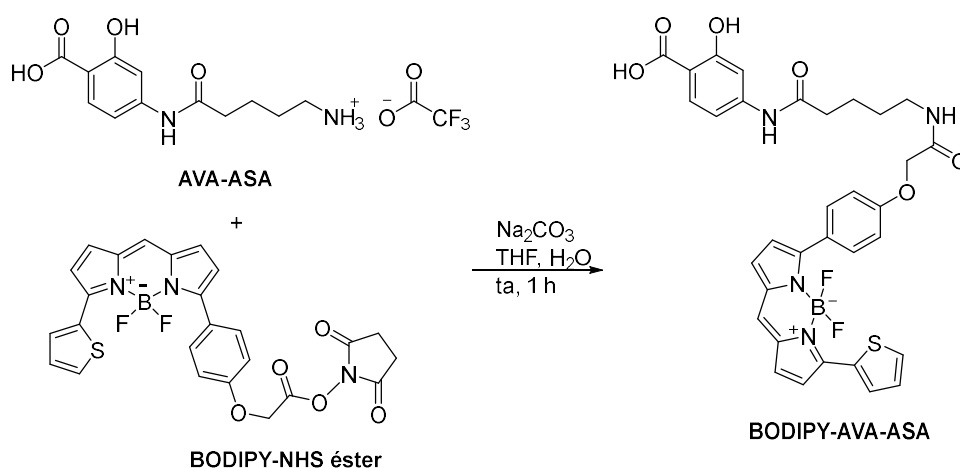


Figura 105. Formación de la amida BODIPY-AVA-ASA en medio básico, mímico de la citrulina marcado fluorescentemente con un BODIPY.

En un matraz de 10 mL se añadieron 3.5 mg (9.6×10^{-3} mmol) de **AVA-ASA** y 3 mg (0.029 mmol) de Na_2CO_3 y el sistema se aisló bajo una atmósfera de argón. Se añadieron 3 mL de una mezcla previamente desoxigenada de THF/ H_2O 1:1 y 5 mg (9.6×10^{-3} mmol) de **BODIPY-NHS-éster** disueltos en 2 mL de la misma mezcla de disolventes. La reacción se dejó con agitación continua durante una hora. Se añadieron 2 mL de una disolución saturada de NaHCO_3 y la fase acuosa se lavó con AcOEt. Se recolectaron las fases acuosas y se acidificaron con HCl 1M. El producto se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo un sólido lila (5 mg; 79%).

^1H -RMN (300 MHz, CD_3DO), δ /ppm: debido a la poca cantidad de producto obtenido solo se observaron algunas señales, así la obtención del producto sólo se pudo confirmar por espectrometría de masas.

MS-ESI $^-$ (MeOH, 2% ácido fórmico): m/z $[\text{M}]^-$ calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_6\text{S}^-$ 657.2 encontrado 656.9.

3. SÍNTESIS DE ELEMENTOS PRECURSORES DE CLPs

3.1. Elementos precursores para la detección de ácidos

Síntesis de la 2,5-bis(2-feniletetil)piridina (BSP)

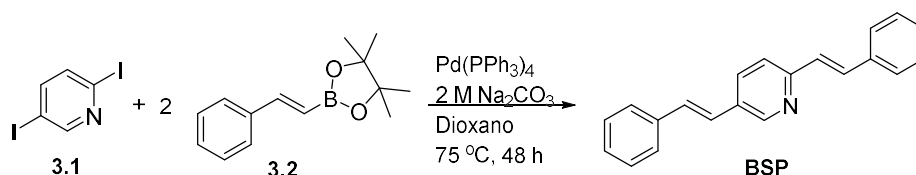


Figura 106. Síntesis del BSP mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

En un matraz de dos bocas de 50 mL acoplado a un refrigerante se introdujeron 70 mg (0.207 mmol) de 1,4-diiodopiridina (**3.1**) y 108 mg (0.455 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-[(E)-2-feniletetil]-1,3,2-dioxaboraleno (**3.2**) y se realizó una atmósfera de argón. Se añadieron 20 mL de dioxano y 5 mL de una disolución acuosa 2 M de Na_2CO_3 . Se burbujeó argón durante 30 min y seguidamente se añadieron 25 mg (0.02 mmol) del catalizador tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$). La reacción se dejó con agitación continua a 75 °C durante 48 h. Se eliminó el disolvente y el crudo de reacción se disolvió en CHCl_3 , se realizaron diversos lavados con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo de reacción se purificó mediante columna de

cromatografía (SiO₂, con un gradiente de hexano-AcOEt 1:1 v/v a 100% AcOEt) se obtuvo un sólido amarillo (49.39 mg, 86%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃Cl), δ/ppm: Se trata de un espectro complejo en el que solo se pudieron asignar algunas de las señales, pero significativas de que la reacción había tenido lugar, entre ellas las procedente del anillo aromático de la piridina y las de los dobles enlaces. 8.72 (d, *J* = 1.90 Hz, 1H, NCHC), 7.89 (dd, *J* = 8.27, *J* = 2.06, 1H, CCHCHCN), 7.66 (d, *J* = 16.06 Hz, 1H, CH=CH), 7.46 (d, *J* = 8.46 Hz, CCHCHCN), 7.09 (d, *J* = 16.31 Hz, 1H, CH=CH).

Síntesis de la N-N'-((2,5-dibromo-1,4-fenilen)bis(metilen))bis(N-etiletanoamina) (MNEt2)

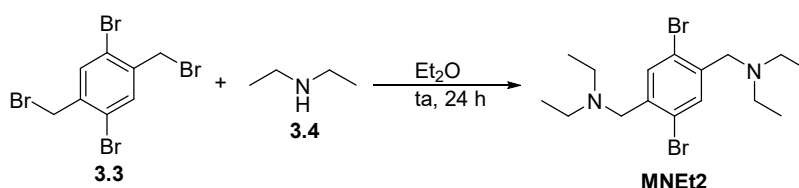


Figura 107. Síntesis del MNEt2 a través de una reacción de sustitución nucleofílica.

0.25 g (0.59 mmol) de 1,4-dibromo-2,5-bis(bromoetil)benceno (**3.3**) se introdujeron en un matraz de 25 mL y se suspendió en 15 mL de Et₂O, seguidamente se añadió 1.2 mL (11.8 mmol) de dietilamina y se dejó con agitación continua durante 24 h. Transcurridas las 24 h se realizaron varios lavados con una disolución saturada de NaCl, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente bajo presión reducida, obteniéndose un aceite amarillo (0.19 g, 80%).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃Cl), δ/ppm: 7.70 (s, 2H, 2x CCHC), 3.57 (s, 4H, 2x NCH₂C), 2.56 (q, *J* = 7.13 Hz, 8H, 4x NCH₂CH₃), 1.05 (t, *J* = 7.11 Hz, 12H, 4x NCH₂CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃Cl), δ/ppm: 139.73 (Ar-CH), 133.90 (Ar), 122.90 (Ar-Br), 56.78 (Ar-CH₂N), 47.39 (NCH₂CH₃), 12.11 (NCH₂CH₃).

Síntesis de la N,N'-(2,5-di((estiril)-1,4-fenilen)bis(metilen)bis(N-etiletanamina) (BSNEt2)

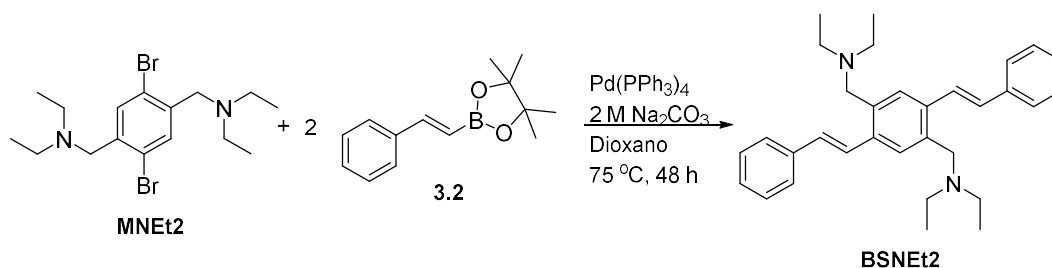


Figura 108. Síntesis del BSNEt2 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

En un matraz de dos bocas de 50 mL acoplado a un refrigerante se introdujeron 50 mg (0.125 mmol) de **MNEt2** y 150 mg de **3.2** (0.63 mmol) y se realizó una atmósfera de argón. Se añadieron 15 mL de dioxano y 4 mL de una disolución acuosa 2 M de Na_2CO_3 . Se burbujeó argón durante 30 min y seguidamente se añadieron 15 mg (0.0125 mmol) del catalizador $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. La reacción se dejó con agitación continua a 75 °C durante 48 h. Se eliminó el disolvente y el crudo de reacción se disolvió en CHCl_3 , se realizaron diversos lavados con una disolución acuosa saturada de NaCl. El crudo de reacción se purificó mediante columna de cromatografía (SiO_2 , hexano-AcOEt de 9:1 v/v a 100% AcOEt) y una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo (28.07 mg, 47%).

^1H -RMN (300 MHz, CD_3Cl), δ/ppm : 7.73 (d, $J = 16.3$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}=\text{CH}$), 7.63 (s, 1H, CCHC), 7.53 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H, $4\times\text{CCHCH}$), 7.36 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H, $4\times\text{CCHCHCH}$), 7.26 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H, $2\times\text{CHCHCHCHCH}$), 7.03 (d, $J = 16.3$ Hz, 2H, $2\times\text{CH}=\text{CH}$), 3.69 (s, 4H, CCHN), 2.60 (d, $J = 7.00$ Hz, 8H, $4\times\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 1.10 (t, $J = 7.05$ Hz, 12H, $4\times\text{NCH}_2\text{CH}_3$).

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3Cl), δ/ppm : 138.13 (Ar), 136.28 (Ar), 128.79 (Ar), 127.80 (Ar), 127.53 (Ar), 126.73 (Ar), 126.62 (Ar), 55.93 (CCHN), 46.81 (NCH_2CH_3), 11.79 (NCH_2CH_3).

3.2. Elementos precursores para la detección del anión carboxilato

Síntesis de la 1-(2,5-dibromofenil)-3-feniltiourea (3.7)

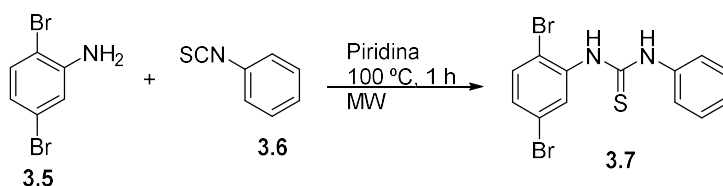


Figura 109. Formación de la tiourea 3.7 haciendo reaccionar el isotiocianato 3.6 con el grupo amino de 2,5-dibromoanilina.

En un matraz de microondas se introdujeron 50 mg (0.195 mmol) de 2,5-dibromoanilina (**3.5**), tras sellar el vial se pasó una corriente de argón durante 30 min. Seguidamente se añadieron 2 mL de piridina y 0.23 mL (1.95 mmol) de fenilisotiocianato (**3.6**). La mezcla se introdujo en el reactor de microondas durante 1 h a 100 °C. Finalmente se eliminó la piridina con ayuda del rotavapor. El sólido se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , DCM – 1% MeOH), obteniéndose un sólido blanco (46.34 mg, 60%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm: 10.13 (s, 1H, NH), 9.44 (s, 1H, NH), 7.79 (d, $J = 2.41$ Hz, 1H, BrCCHCCBr), 7.62 (d, $J = 8.63$ Hz, 1H, Ar), 7.51 (d, $J = 7.92$ Hz, 1H, Ar), 7.36 (m, 2H, Ar), 7.16 (t, $J = 7.28$ Hz, CHCHCHCHCH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm: 180.07 (C=S), 139.49 (Ar), 138.89 (Ar), 137.17 (Ar), 134.08 (Ar), 132.38 (Ar), 130.45 (Ar), 128.63 (Ar), 124.95 (Ar), 123.90 (Ar), 119.71 (Ar).

Síntesis del 2,5-di((*E*)-estiril)anilina (DSA)

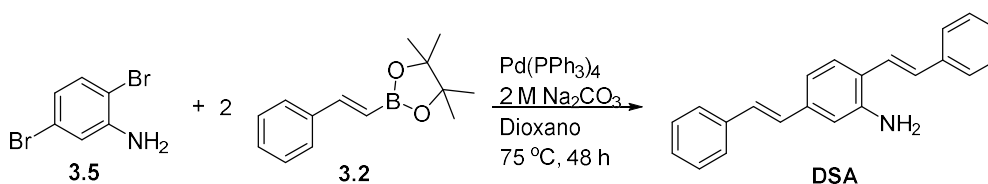


Figura 110. Síntesis de la amina DSA mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Heck.

En un matraz de dos bocas de 50 mL provisto de un refrigerante se introdujeron 50 mg (0.195 mmol) de 2,5-dibromoanilina (**3.5**), 102 mg (0.43 mmol) de **3.2** y 25 mg (0.02 mmol) de catalizador $\text{Pd(PPh}_3)_4$ y se realizó una atmósfera inerte de argón. Seguidamente se añadieron 15 mL de dioxano y 6 mL de una disolución acuosa 2 M de Na_2CO_3 y se dejó con agitación continua

a 100 °C durante 16 h. El disolvente se eliminó a presión reducida obteniéndose un sólido marrón oscuro que se redisolvió en CHCl₃. La disolución se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente. El sólido marrón obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, hexano-DCM 9:1, v/v). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo (29 mg, 48%).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 7.63 (d, *J* = 14.78 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 14.78 Hz, 2H), 7.48 (m, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.36 (dt, *J* = 7.74 Hz, *J* = 3.55 Hz, 3H), 7.24 (m, 2H), 7.10 (s, 1H, CCHCNH₂), 7.04 (d, *J* = 16.09 Hz, 1H, CH=CH), 6.86 (m, 2H), 5.44 (s, 2H, NH₂).

HRMS (MALDI): m/z [M]⁺ calculado para C₂₂H₁₉N⁺ 297.1517 encontrado 297.1518.

Síntesis del 1-(2,5-dibromofenil)-3-(4-nitrofenil)urea (3.9)

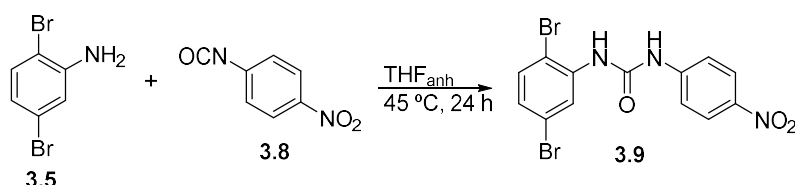


Figura 111. Formación de la nitro-urea-dibromada 3.9 por reacción entre el isocianato 3.8 y el grupo amino de 3.5.

En un matraz de 25 mL de dos bocas provisto de un refrigerante se introdujo 50 mg (1.95 mmol) de 2,5-dibromoanilina (**3.5**) y 80 mg (4.87 mmol) de 4-nitrofenil isocianato (**3.8**) y se aisló el sistema con una corriente de argón. Se añadieron 2 mL de THF_{anh} y la reacción se dejó con agitación continua durante 24 h. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente obteniendo un sólido amarillo que se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, DCM – 1% MeOH). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo (45.9 mg, 56%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm: 10.25 (s, NH), 8.47 (s, NH), 8.33 (d, *J* = 2.37 Hz, 1H, BrCCHCNH), 8.22 (m, 2H, Ar-NO₂), 7.72 (m, 2H, Ar-NO₂), 7.62 (d, *J* = 8.52 Hz, 1H, BrCCHCHC), 7.22 (dd, *J* = 8.52 Hz, *J* = 2.39 Hz, 1H, BrCCHCHC).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm: 151.67 (C=O), 145.77 (Ar), 141.46 (Ar), 138.05 (Ar), 134.18 (Ar), 127.07 (Ar), 125.20 (Ar), 124.24 (Ar), 120.73 (Ar), 117.76 (Ar), 112.08 (Ar).

MS-ESI⁺ (CH₃OH): m/z [M+H]⁺ calculado para C₁₃H₁₀Br₂N₃O₃⁺ 413.9 encontrado 413.7.

Síntesis de la 1-(2,5-di((E)-estiril)fenil)-3-(4-nitrofenil)urea (BDSNU)

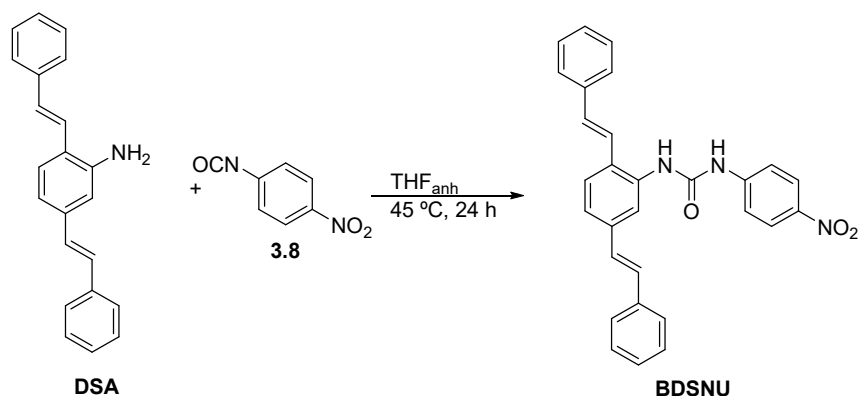


Figura 112. Formación de la urea BDSNU a partir de la reacción del nitro-isocianato 3.8 con el grupo amino de la DSA.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis de **3.9** y el producto se purificó por cromatografía de alúmina en placa preparativa (Al_2O_3 , DCM) obteniendo un sólido amarillo (3.5 mg, 23%).

$^1\text{H-RMN}$ (700 MHz, DMSO-d_6), δ/ppm : 9.73 (s, NH), 8.63 (s, NH), 8.21 (d, $J = 9.17$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.75 (m, 3H), 7.65 (m, 4H), 7.41 (m, 12H).

MS-ESI^+ (CH_3OH): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}^+$ 484.2 encontrado 484.2.

Síntesis de la 1-(3,5-Bis(trifluorometil)fenil)-3-(2,5-di((E)-estiril)fenil)urea (BDSU).

Procedimiento 1

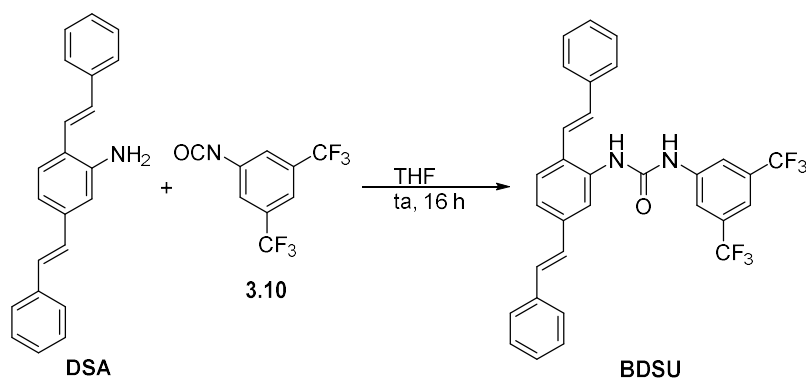


Figura 113. Formación de la urea BDSU por reacción entre el isocianato 3.10 y el grupo amino de la DSA. Procedimiento 1.

10 mg (0.034 mmol) de **DSA** se introdujeron en un matraz de 10 mL, se realizó una atmósfera inerte con argón y se añadieron 13 mg (0.051 mmol) de 3,5-bis(trifluorometil)fenil isocianato (**3.10**) disueltos en 5 mL de THF_{anh}. La reacción se dejó con agitación continua a temperatura ambiente durante 16 h. Una vez eliminado el disolvente a presión reducida, el sólido marrón obtenido se suspendió en DCM, se sonicó durante 1 min y seguidamente se centrifugó a 13400 rpm durante 4 min. Se descartó el sobrenadante y el sólido se secó en la estufa de vacío obteniéndose un sólido blanco (14.5 mg, 84%).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 9.66 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1 H, NH), 8.17 (s, 2H, 2xHNCCHC), 7.93 (s, 1H, CF₃CCHCCF₃), 7.78 (d, J = 8.27 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 7.25 Hz, 5H), 7.41-7.24 (m, 11H).

HRMS (MALDI): m/z [M]⁺ calculado para C₃₁H₂₂F₆N₂O⁺ 552.1636 encontrado 552.1613.

Procedimiento 2

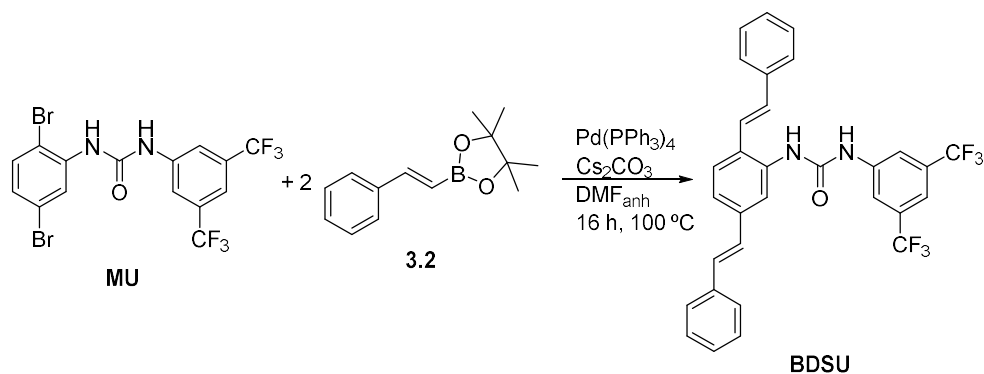


Figura 114. Formación de la urea BDSU por reacción entre el isocianato 3.10 y el grupo amino de la DSA. Procedimiento 2.

En un matraz de dos bocas de 25 mL provisto de un refrigerante se introdujeron 10 mg (0.0197 mmol) de **MU**, 10.3 mg (0.043 mmol) de **3.2**, 642 mg (0.197 mmol) de CsCO₃, y 2.5 mg (0.002 mmol) de catalizador Pd(PPh₃)₄ y se realizó una atmósfera inerte de argón. Seguidamente se añadió 10 mL DMF_{anh} y se dejó con agitación continua a 100 °C durante 16 h. Se eliminó parte del disolvente a presión reducida, seguidamente se añadió DCM hasta la aparición de un precipitado que se centrifugó a 13400 rpm durante 4 min. Se descartó el sobrenadante y el sólido se secó en la estufa de vacío obteniéndose un sólido blanco (6.2 mg, 57%).

Síntesis del (E)-2-(2,5-dimetoxiestiril)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (**3.13**)

Procedimiento 1

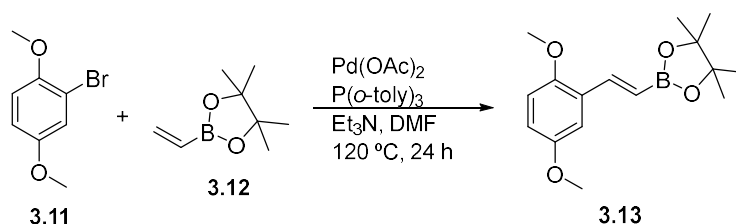


Figura 115. Síntesis de **3.13** mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Heck. Procedimiento 1.

En un matraz de 25 mL de dos bocas provisto de un refrigerante se introdujeron 25 mg (0.11 mmol) del catalizador $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ y 50 mg (0.16 mmol) de cocatalizador tri-(*o*-tolil)fosfina y se aisló el sistema con argón. Se añadieron 10 mL de DMF_{anh} , 3 mL de Et_3N y finalmente 0.32 mL (1.8 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxoborolano (**3.12**). Se calentó la reacción a 120°C y se añadió 0.07 mL (0.45 mmol) de 1-bromo-2,5-dimetoxibenceno (**3.11**) diluidos en 1 mL. La reacción se dejó con agitación continua durante 24 h. Transcurridas las 24 h se evaporó la DMF y el crudo de reacción se disolvió en AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl 10%, con agua y finalmente con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente. El aceite marrón obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , con un gradiente de hexano:DCM 1:1 v/v, a 100% DCM). Fue necesaria una segunda columna de cromatografía (SiO_2 , DCM: 2% MeOH) para terminar de eliminar las impurezas. Finalmente se evaporó el disolvente y se obtuvo un aceite amarillo oscuro (8 mg, 6%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7.74 (d, $J = 18.59$ Hz, 1H, CH=CH), 7.10 (d, $J = 2.35$ Hz, Ar), 6.15 (m, 2H, Ar), 6.17 (d, $J = 18.52$ Hz, 1H, CH=CH), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 1.31 (s, 12H, $4\times\text{CCH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 153.66 (Ar-O), 151.97 (Ar-O), 143.98, 127.37, 117.54, 115.71, 112.39, 111.83, 83.40 (BOCCH_3), 56.19 (OCH_3), 55.81 (OCH_3), 24.96 (CCH_3).

Procedimiento 2

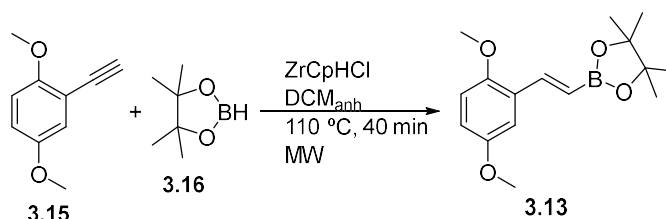


Figura 116. Reducción del triple enlace de 3.15 para la formación del vinilborano 3.13 empleando el catalizador de Zirconio (reactivos de Schwartz). Procedimiento 2.

En un vial de microondas se pesaron 84 mg (0.32 mmol) de catalizador cloruro de bis(η 5-ciclopentadienil) dihidruro de circonio (reactivo de Schwartz). Tras sellar el vial se creó una atmósfera de argón y se añadió 1 mL de DCM_{anh} enfriado previamente en un baño de hielo. El vial se introdujo en un baño de hielo. Se añadió gota a gota 1.5 mL de una disolución fría de DCM_{anh} que contenía 100 mg (0.62 mmol) de 2-etinil-1,4-dimetoxibenceno (**3.15**). Seguidamente se añadieron 0.8 mL (0.94 mmol) del éster borónico **3.16**. Se dejó que la reacción alcanzase temperatura ambiente y se introdujo en el reactor de microondas durante 45 min a 110 °C. Transcurrido este tiempo el crudo de reacción se disolvió en Et₂O y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente obteniéndose un sólido amarillo oscuro (160 mg, 93%).

Síntesis del ((2,5-dimetoxifenil)etnil)trimetilsilano (**3.14**)

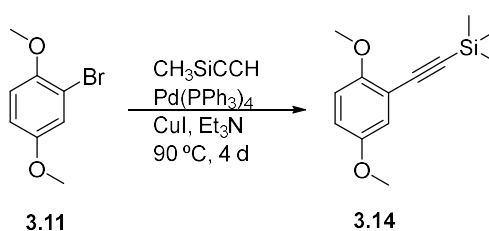


Figura 117. Síntesis de 3.14 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Sonogashira.

En un matraz de dos bocas de 25 mL provisto con un refrigerante se añadieron 0.18 g (0.15 mmol) del catalizador Pd(PPh₃)₄ y 0.06 g (0.3 mmol) del cocatalizador de cobre CuI y se aisló el sistema con argón. Se añadieron 12 mL de Et₃N y se burbujeó argón durante 15 min. Seguidamente se añadieron 0.45 mL (3 mmol) de 2-bromo-1,4-dimetoxibenceno (**3.11**), 1.3 mL (9 mmol) de etinil(trimetil)silano y se dejó la reacción con agitación continua a 90 °C durante 4 días. Transcurridos los 4 días se empleó un embudo de fritas de poro 4 para eliminar los sólidos

del matraz de reacción. Se añadió DCM y se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente. El aceite marrón obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, hexano:DCM 2:1, v/v). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un aceite amarillo-marrón (0.237 mg, 49%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 6.97 (dd, *J* = 0.51 Hz, *J* = 3.00 Hz, 1H, CCHC), 6.80 (m, 2H, Ar), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 0.27 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

Síntesis del 2-etinil-1,4-dimetoxibenceno (3.15)

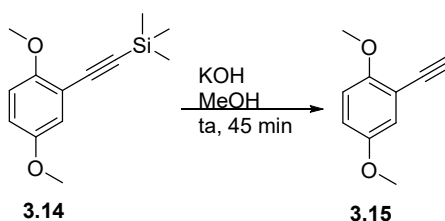


Figura 118. Eliminación del trimetilsilano de 3.14 en medio básico.

En un matraz de 25 mL de dos bocas se añadió 0.2 g (0.85 mmol) de ((2,5-dimetoxifenil)etinil)trimetilsilano (**3.14**) disueltos 4 mL de MeOH. Seguidamente se añadieron 9 mL de una disolución en MeOH de KOH 0.14 M y se dejó con agitación continua a temperatura ambiente durante 45 min. Transcurrido este tiempo se añadió un gran exceso de agua y se extrajo el producto con varios lavados con Et₂O. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente obteniendo un sólido amarillo (0.135, 97%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7.01 (d, *J* = 3.00 Hz, 1H, CCHC), 6.83 (m, 2H, Ar), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.30 (s, 1H, C≡CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 155.20 (ArC-OCH₃), 153.23 (ArC-OCH₃), 118.87 (Ar), 116.38 (Ar), 112.02 (Ar), 111.69 (Ar), 81.21(CCH), 80.13 (C≡CH) 56.51 (OCH₃), 55.91 (OCH₃).

Síntesis 2,5-Bis((E)-2,5-dimetoxiestiril)anilina (DMA)

Procedimiento 1

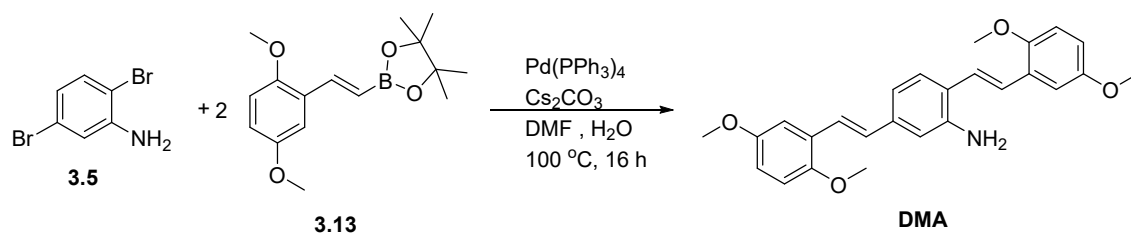


Figura 119. Formación de la amina DMA a través de una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki. Procedimiento 1.

En un matraz de dos bocas de 25 mL provisto de un refrigerante se añadieron 20 mg (0.08 mmol) de 2,5-dibromoanilina (**3.5**) y 9 mg (0.008 mmol) de $\text{Pd(PPh}_3)_4$ y se realizó una atmósfera inerte con argón. Seguidamente se añadieron 7 mL (0.8 mmol) de DMF y 261 mg de Cs_2CO_3 disueltos en 1 mL de H_2O . Se pasó una corriente argón durante 15 min y se añadieron 60 mg de **3.13** (0.2 mmol) disueltos en 2 mL de DMF. La reacción se dejó con agitación continua a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Transcurridas 24 h se eliminó el máximo disolvente posible con ayuda del rotavapor y se añadió DCM. La fase orgánica se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, obteniendo un sólido marrón. Este sólido se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , DCM). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo (88 mg, 68%).

Solo se pudo confirmar por **MS-ESI⁺ (MeOH, 2% ácido fórmico): m/z [M]⁺** calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ 418.2 encontrado 418.2.

Procedimiento 2

1) Síntesis de la 2,5-Divinilanilina (DVA)

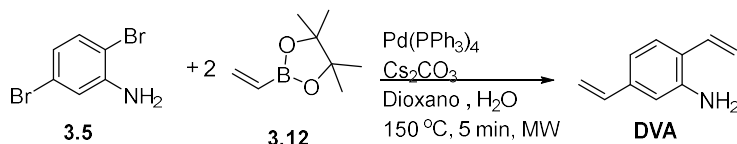


Figura 120. Formación de la DVA a través de un acoplamiento tipo Suzuki.

500 mg (2 mmol) de 2,5-dibromoanilina (**3.5**), 0.23 mg (0.2 mmol) de $\text{Pd(PPh}_3)_4$ y 652 mg (2 mmol) de Cs_2CO_3 se introdujeron en un vial de microondas. Tras sellar el vial se realizó una atmósfera de argón y se añadieron 12 mL de una mezcla de dioxano: H_2O (1:1, v/v). Finalmente

se añadieron 0.86 mL (5 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (**3.12**) y se introdujo la reacción en el microondas durante 5 min a 150 °C. Transcurrido este tiempo la reacción se diluyó en AcOEt, se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente. El sólido marrón obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, con un gradiente de hexano-AcOEt 9:1 a 1:1, v/v). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo pegajoso (0.15 g, 58%).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7.25 (d, *J* = 8.54 Hz, 1H, CCHCNH₂), 6.89-6.58 (m, 4H), 5.71-5.59 (m, 2H, CH=CH₂), 5.31-5.23 (m, 2H, CH=CH₂) 4.32 (sa, 2H, NH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 143.65 (CNH₂), 138.14 (CCH₂CNH₂), 136.72 (Ar), 132.41 (Ar), 127.54 (Ar), 123.94 (H₂NCCCH), 117.40 (Ar), 115.63 (Ar), 114.05 (Ar), 113.80 (Ar).

HRMS (MALDI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₁₀H₁₁N⁺ 145.0891 encontrado 145.0889.

2) Síntesis 2,5-Bis((*E*)-2,5-dimetoxiestiril)anilina (DMA)

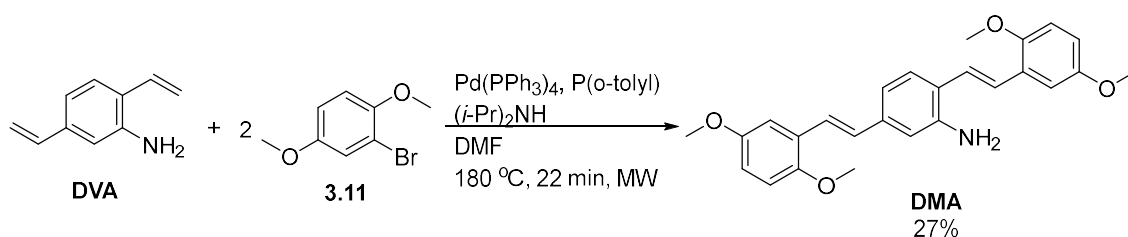


Figura 121. Formación de la DMA a través de un acoplamiento tipo Heck. Procedimiento 2.

50 mg de **DVA** (0.382 mmol), 3.5 mg (0.015 mmol) de Pd(OAc)₂ y 23 mg (0.076 mmol) de tri(*o*-tolil)fosfina se introdujeron en un vial de microondas y se selló. Se realizó una atmósfera de argón, se añadieron 3 mL de DMF_{anh}, 0.14 mL (0.956 mmol) de diisopropilamina y 0.14 mL (0.918 mmol) de 1-bromo-2,5-dimetoxibenceno (**3.11**). La reacción se calentó a 180 °C durante 22 min en el reactor de microondas. Transcurrido este tiempo la reacción se diluyó en DCM, se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente. El sólido marrón obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, con un gradiente de DCM a DCM – 5% MeOH). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo (43 mg, 27%).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7.40 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.24 (m, 3H), 7.10 (d, *J* = 16.49 Hz, 1H), 6.98-6.65 (m, 7H).

HRMS (MALDI): *m/z* [M]⁺ calculado para C₂₆H₂₇NO₄⁺ 417.1940 encontrado 417.1924.

Síntesis de la 1-(2,5-Bis((*E*)-2,5-dimetoxiestiril)fenil)-3-(3,5-bis(trifluorometil) fenil)urea (BMSU)

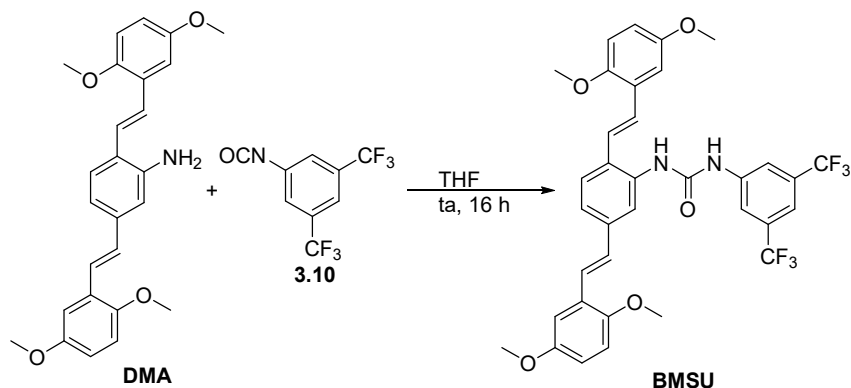


Figura 122. Formación de la urea BMSU por reacción entre el grupo amino de la DMA y el isocianato 3.10.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis del **BDSU**. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , hexano-AcOEt 7:3, v/v). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo (14.85 mg, 58%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm: 9.64 (s, 1H, NH), 8.61 (s, 1H, NH), 8.15 (s, 2H, 2xHNCCHC), 7.88 (s, 1H, $\text{CF}_3\text{CCHCCF}_3$), 7.69 (d, $J = 1.42$ Hz, 2 H), 7.66 (m, 2 H), 7.38 – 7.24 (m, 7 H), 6.98 (dd, $J = 9.00$ Hz, $J = 1.62$ Hz, 2H), 6.87 (dt, $J = 9.16$ Hz, $J = 2.93$ Hz, 2H), 3.78 (m, 12 H, 4x OCH_3)

HRMS (MALDI): m/z $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_5^+$ 672.2059 encontrado 672.2055.

Síntesis del dimetil-2-viniltetrafalato (3.19)

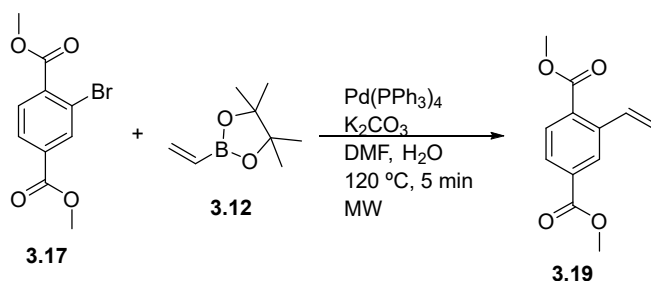


Figura 123. Síntesis de 3.19 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Heck.

En un matraz de microondas se añadieron 50 mg (0.183 mmol) de 2,4-dimetilbromotetrafalato (**3.17**), 2 mg del catalizador de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (1.83×10^{-4} mmol), se selló el matraz y se aisló el sistema

con argón. Seguidamente se añadió 1 mL de DMF y 60 mg (0.183 mmol) de Cs_2CO_3 disueltos en 1 mL de H_2O . Finalmente se añadieron 0.05 mL (0.28 mmol) de 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (**3.12**) y se introdujo la reacción en el reactor microondas durante 5 min a 120 °C. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente, el crudo se suspendió en agua y se extrajo el producto con DCM. La fase orgánica se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente obteniéndose un aceite amarillo oscuro. El aceite obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , hexano-DCM 1:5, v/v). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un aceite amarillo (37.52 mg, 91%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8.24 (d, $J = 1.58$, 1H, CCHC), 7.92 (m, 2H, Ar), 7.41 (dd, $J = 17.45$ Hz, $J = 11.00$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.76 (dd, $J = 17.42$ Hz, $J = 1.07$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.43 (dd, $J = 10.98$ Hz, $J = 1.06$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.94 (s, 3H, COOCH_3), 3.92 (s, 3H, COOCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 167.38 (COOCH_3), 166.37 (COOCH_3), 139.67 (ArC- COOCH_3), 134.96 (Ar), 133.27 (Ar), 132.50 (Ar), 130.48 (Ar), 128.45 (Ar), 128.22 (Ar), 117.87 (C=CH), 52.57 (COOCH_3).

Síntesis del dimetil 2-((trimetilsilil)etnil)tereftalato (**3.20**)

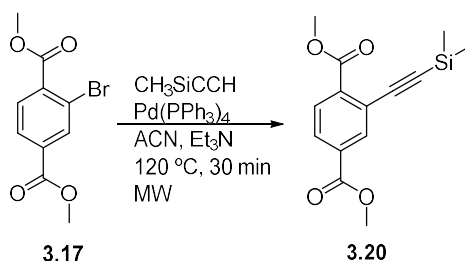


Figura 124. Síntesis de 3.14 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Sonogashira.

En un matraz de microondas se añadieron 1.66 g (6 mmol) de 2,4-dimetilbromoeftalato (**3.17**), 0.46 g (0.3 mmol) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y 0.12 g (0.6 mmol) de CuI, se selló el matraz y purgó el sistema con argón. Se añadieron 2 mL de ACN y 2 mL de Et_3N y se burbujeó argón durante 15 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 0.84 mL (6 mmol) de etnil(trimetil)silano y se introdujo la reacción en el reactor microondas durante 30 min a 120 °C. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente, el crudo se suspendió en agua y se extrajo el producto con DCM. La fase orgánica se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente obteniéndose un líquido negro. El líquido negro obtenido se

purifico por cromatografía en columna (SiO_2 , hexano-DCM 1:1, v/v). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un líquido viscoso negro (0.9 mg, 51%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8.17 (d, $J = 1.62$ Hz, 1H, CCHC), 7.80 (m, 2H, Ar), 3.89 (s, 6H, COOCH_3), 0.24 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 166.41 ($\text{C}=\text{O}$), 166.76 ($\text{C}=\text{O}$), 136.25 (Ar), 135.66 (Ar), 132.94 (Ar), 130.45 (Ar), 129.00 (Ar), 123.67 (Ar), 102.23 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 101.16 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 52.71 (OCH_3), 52.45 (OCH_3), -0.05 (SiCH_3).

Síntesis del dimetil 2-etiniltereftalato (3.21)

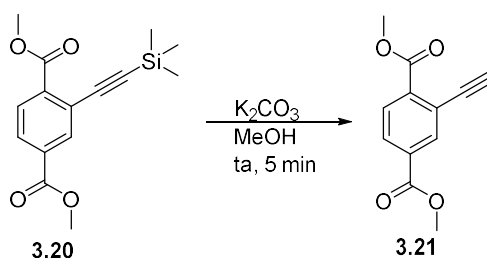


Figura 125. Eliminación del trimetilsilano de 3.20 en medio básico.

En un matraz de 10 mL se pesaron 0.1 g (0.69 mmol) de dimetil-2-((trimetilsilil)etnil)tereftalato (3.20) y se disolvieron en 4 mL de MeOH, 0.05 g (0.69 mmol) de K_2CO_3 se suspendieron en 1 mL de MeOH y se añadieron al matraz de reacción. Transcurridos 5 min y comprobando por CCF (hexano-DCM 1:5, v:v) que la reacción estaba completa se añadieron 5 mL de H_2O y se extrajo el producto con AcOEt. La fase orgánica se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente obteniéndose un sólido marrón (57mg, 76%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 8.25 (d, $J = 1.35$ Hz, 1H, CCHC), 8.00 (m, 2H, Ar), 3.94 (s, 6H, COOCH_3), 3.44 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 165.92 (COOCH_3), 165.56 (COOCH_3), 136.19 (ArC- COOCH_3), 136.00 (Ar), 133.14 (ArC- COOCH_3), 130.46 (Ar), 129.36 (Ar), 123.02 (Ar), 83.34($\text{C}\equiv\text{CH}$), 81.18 ($\text{C}\equiv\text{CH}$) 52.73 (COOCH_3), 52.61 (COOCH_3).

Síntesis del tetrametil 2,2'-((1*E*,1'*E*)-(2-amino-1,4-fenilen) bis(eteno-2,1-diil)) ditereftalato (DPA) empleando la DVA

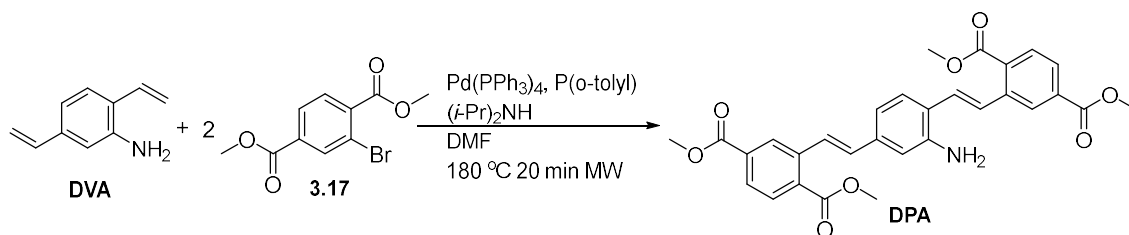


Figura 126. Formación de la amina DPA a través de una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis de la **DMA**. En este caso, para la purificación la reacción se diluyó en AcOEt, se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente. El sólido marrón obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, hexano-AcOEt 1:1, v/v). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo (47 mg, 14%)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8.39 (d, *J* = 3.68, 2H), 7.99 – 7.90 (m, 5H), 7.80 (d, *J* = 16.17 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.01, 1H), 7.16 (d, *J* = 16.17 Hz, 1H, CH=CH), 7.06 (d, *J* = 16.17 Hz, 1H, CH=CH), 7.03 (d, *J* = 7.81 Hz, 1H), 6.94 (s, 1 H), 3.96 (m, 12H, 4xCOOCH₃)

HRMS (MALDI): *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₂₆H₂₈NO₄⁺ 530.1809 encontrado 530.1795.

Síntesis del tetrametil 2,2'-((1*E*,1'*E*)-(2-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ureido)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))ditereftalato (BPSU)

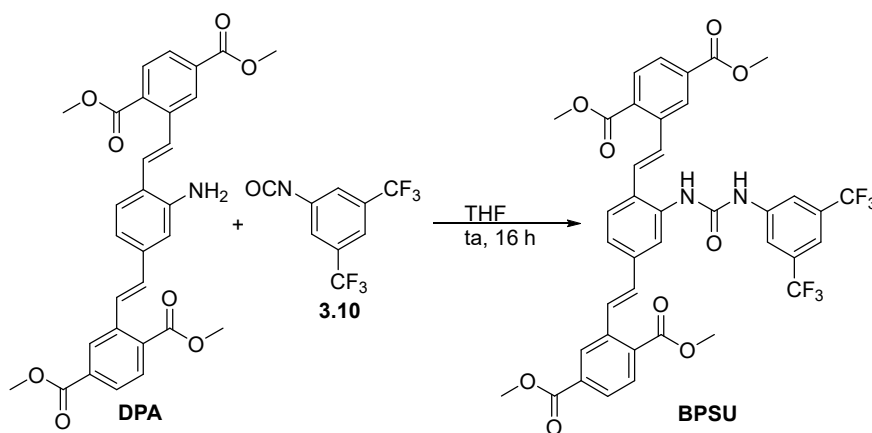


Figura 127. Formación de la urea BPSU por reacción del grupo amino de la DPA y el isocianato.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis de la **BDSU**. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , hexano-AcOEt 1:1, v/v). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido amarillo (9 mg, 53%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm : 9.63 (1H, NH), 8.77 (1H, NH), 8.37 (d, $J = 15.8$ Hz, CH=CH), 7.35 (d, $J = 15.9$ Hz, CH=CH), 3.9 (m, 12H, $4 \times \text{COOCH}_3$)

HRMS (MALDI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{30}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}^+$ 817.1721 encontrado 817.1753.

4. SÍNTESIS DE CLPs

4.1. Síntesis de monómeros

Síntesis del 2-(2-metoxietoxi)etil 4-metilbencenosulfonato (TsOR).

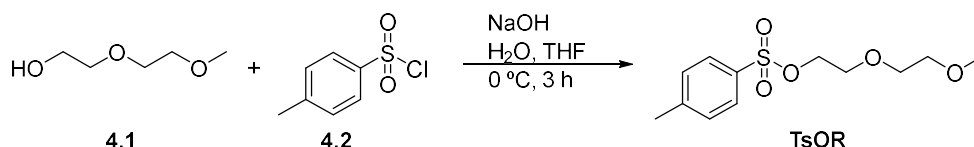


Figura 128. Tosilación del alcohol.

En un matraz de una boca de 100 mL se introdujeron 1.1 g (8.5 mmol) de 2-(2-metoxietoxi)-etanol (**4.1**) disueltos en 25 mL de THF y se enfriaron en un baño de hielo. 0.5 g (12.5 mmol) de NaOH disueltos en 5 mL de agua se añadieron sobre la disolución del alcohol. 1.9 g (9.5 mmol) de cloruro de *p*-toluensulfonilo (**4.2**) se disolvieron en 2.5 mL de THF y se añadieron gota a gota en el matraz de reacción, dejándose con agitación continua a una temperatura inferior a 5 °C durante 3 h. Transcurrido este tiempo se añadieron 50 mL de una mezcla de agua y hielo y se extrajo con DCM. La fase orgánica se lavó con HCl 0.1 M y con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, obteniéndose un aceite ligeramente amarillo (1.95 g, 84 %).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7.73 (d, $J = 8.35$ Hz, 2H, Ar), 7.27 (d, $J = 8.21$ Hz, 2H, Ar), 4.10 (t, $J = 4.86$ Hz, 2H, $\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.62 (t, $J = 4.85$ Hz, 2H, $\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.50 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.41 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.28 (s, 3H, OCH_3), 2.38 (s, 3H, ArCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 145.11 (Ar), 133.28 (Ar), 130.12 (Ar), 128.29 (Ar), 72.11 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.98 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.53 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.01 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 59.35 (OCH_3), 21.95 (ArCH_3).

Síntesis del 1,4-diyodo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno (dIB)

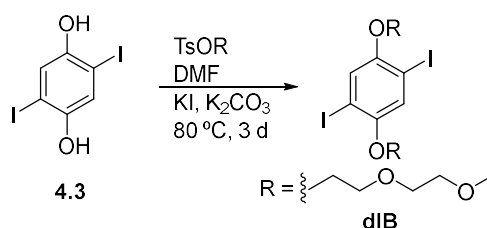


Figura 129. Síntesis de dIB mediante una reacción de sustitución nucleofílica.

En un matraz de dos bocas de 50 mL se introdujeron 0.5 g de (1.35 mmol) 2,5-diiodo-1,4-benzenodiol (**4.3**), 0.81 g (2.97 mmol) de **TsOR**, 0.84 g (6.08 mmol) de K_2CO_3 y 0.22 g (1.35 mmol) de KI y se aisló el sistema con argón. Se añadieron 25 mL de DMF, se calentó el matraz a 80°C y se dejó con agitación continua durante 3 días. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente con ayuda del rotavapor y el crudo de reacción se suspendió en DCM. Se realizaron diferentes lavados con una disolución acuosa al 10% de KOH, agua y una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, obteniéndose un sólido marrón (0.69 g, 91 %).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7.24 (s, 2H, Ar), 4.11 (t, $J = 4.84$ Hz, 4H, $2\text{xArOCH}_2\text{CH}_2$), 3.88 (t, $J = 4.84$ Hz, 4H, $2\text{xArOCH}_2\text{CH}_2$), 3.78 (m, 4H, $2\text{xOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.58 (m, 4H, $2\text{xOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.40 (s, 6H, 2xOCH_3).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 153.12 (Ar), 123.49 (Ar), 86.42 (Ar), 72.08 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71.10 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.35 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.65 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 59.17 (OCH_3).

Síntesis del 1,4-dibromo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno (dBrB)

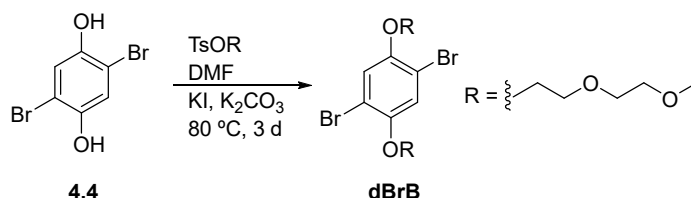


Figura 130. Síntesis de dBrB mediante una reacción de sustitución nucleofílica.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis de **dIB**, obteniéndose un sólido marrón (0.83 g, 93 %).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7.15 (s, 2H, Ar), 4.13 (t, $J = 4.84$ Hz, 4H, $2\text{xArOCH}_2\text{CH}_2$), 3.87 (t, $J = 4.84$ Hz, 4H, $2\text{xArOCH}_2\text{CH}_2$), 3.76 (m, 4H, $2\text{xOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.57 (m, 4H, $2\text{xOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.39 (s, 6H, 2xOCH_3).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 150.34 (Ar), 119.17 (Ar), 111.40 (Ar), 72.06 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71.04 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.26 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.63 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 59.14 (OCH_3).

Síntesis del ((2,5-bis(2-(2-metoxetox)etoxi)-1,4-fenileno)bis(etin-2,1-diil)) bis(trimetilsilano) (4.5)

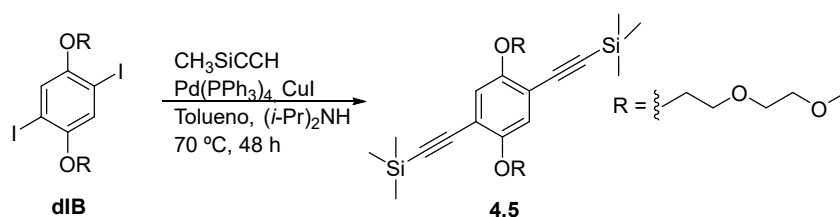


Figura 131. Síntesis de 4.4 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Sonogashira

En un matraz de dos bocas de 100 mL provisto de un refrigerante se introdujeron 1.5 g (2.65 mmol) de **dIB**, 60 mg (0.05 mmol) del catalizador $\text{Pd(PPh}_3)_4$, 0.126 g (0.66 mmol) de CuI y se aisló el sistema con argón. Se añadieron 45 mL de una mezcla de disolventes tolueno: $(i\text{-Pr})_2\text{NH}$ 7:3 y 1.2 mL (7.95 mmol) de etiniltrimetilsilano. La mezcla de reacción se calentó a 70°C y se dejó con agitación continua durante 48 h. Finalizada la reacción se eliminó el disolvente, el crudo de reacción se suspendió en DCM, se filtró para eliminar el CuI y facilitar así los lavados de la fase orgánica con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl . Se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, obteniéndose un sólido marrón que se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , CHCl_3). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido marrón claro (1.23 g, 91%).

Para la síntesis de **4.5** partiendo de **dBrB** se siguió el mismo procedimiento empleando 1.25 g de (2.65 mmol) de **dBrB** y se obtuvo un rendimiento del 81 %.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 6.90 (s, 2H, Ar), 4.12 (t, $J = 4.83$ Hz, 4H, $2\text{xArOCH}_2\text{CH}_2$), 3.86 (t, $J = 4.83$ Hz, 4H, $2\text{xArOCH}_2\text{CH}_2$), 3.76 (m, 4H, $2\text{xOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.55 (m, 4H, $2\text{xOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.38 (s, 6H, 2xOCH_3), 0.29 (s, 6H, $2\text{xSi(CH}_3)_3$).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 153.55 (Ar-O), 117.47 (Ar), 113.88 (Ar), 100.54 (C≡C), 100.02 (C≡C), 71.17 (OCH₂CH₂O), 70.78 (OCH₂CH₂O), 69.40 (OCH₂CH₂O), 69.27 (OCH₂CH₂O), 58.74 (OCH₃), 0.37 (Si(CH₃)₃).

Síntesis del 1,4-dietinil-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno (4.6)

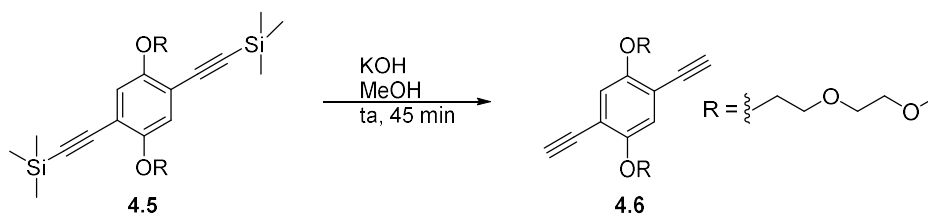


Figura 132. Eliminación del trimetilsilano de 4.5 en medio básico.

1.2 g (2.37 mmol) de **4.5** se disolvieron en 20 mL de MeOH y se añadieron gota a gota en un matraz de 250 ml sobre una disolución KOH en MeOH (0.46 g en 50 mL). La reacción se dejó con agitación continua a temperatura ambiente durante 45 min. Tras este tiempo se añadieron 50 mL de agua y se extrajo el producto con Et₂O. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, obteniéndose un sólido marrón (0.76 g, 95%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 7.00 (s, 2H, Ar), 4.16 (t, *J* = 4.96 Hz, 4H, 2xArOCH₂CH₂), 3.87 (t, *J* = 4.95 Hz, 4H, 2xArOCH₂CH₂), 3.74 (m, 4H, 2xOCH₂CH₂O), 3.57 (m, 4H, 2xOCH₂CH₂O), 3.39 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.32 (s, 2H, C≡CH).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 154.19 (Ar-O), 118.43 (Ar), 113.70 (Ar), 82.85 (C≡C), 79.71 (C≡C), 72.17 (OCH₂CH₂O), 71.13 (OCH₂CH₂O), 69.76 (OCH₂CH₂O), 69.66 (OCH₂CH₂O), 59.25 (OCH₃).

Síntesis del 2,2'-((1E,1'E)-(2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano) (BEB)

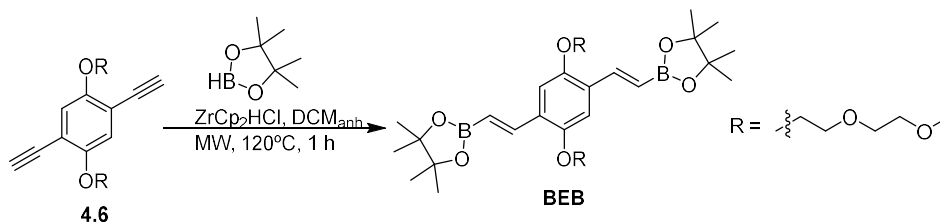


Figura 133. Reducción del triple enlace de 4.6 para la formación del vinilborano BEB empleando el catalizador Schwartz.

En un vial de microondas se pesaron 84 mg (0.32 mmol) del catalizador de Schwartz. Tras sellar el vial se creó una atmósfera de argón y se añadió 1 mL de DCM_{anh} enfriado previamente en un baño de hielo. El vial se introdujo en un baño de hielo y se añadieron 1.5 mL de una disolución fría de DCM_{anh} que contenía 200 mg (0.64 mmol) de **4.6**. Seguidamente se añadieron 0.61 mL (0.72 mmol) de pinacolborano. Se dejó que la reacción alcanzase temperatura ambiente y se introdujo en el reactor de microondas durante 60 min a 120 °C. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se disolvió en Et₂O y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente obteniéndose un sólido amarillo oscuro (204 mg, 55%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 7.70 (d, 2H, *J* = 18.58 Hz, 2xCH=CH), 7.09 (s, 2H, Ar), 6.13 (d, 2H, *J* = 18.54 Hz, 2xCH=CH), 4.14 (t, *J* = 4.97 Hz, 4H, 2xArOCH₂CH₂), 3.88 (t, *J* = 4.95 Hz, 4H, 2xArOCH₂CH₂), 3.74 (m, 4H, 2xOCH₂CH₂O), 3.59 (m, 4H, 2xOCH₂CH₂O), 3.40 (s, 6H, 2xOCH₃), 1.30 (s, 24, 8xBOCCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 151.33 (Ar), 143.68 (CH=CH), 128.65 (Ar), 114.60 (CH=CH), 111.54 (Ar), 83.37 (BOCCH₃), 72.18 (OCH₂CH₂O), 71.01 (OCH₂CH₂O), 69.92 (OCH₂CH₂O), 69.12 (OCH₂CH₂O), 59.25 (OCH₃), 24.98 (BOCCH₃).

MS-ESI⁺ (DCM, CH₃OH): m/z [M+Na]⁺ calculado para C₃₂H₅₂B₂O₁₀Na⁺ 641.3 encontrado 641.3.

Síntesis del 1,4-bis((trimetilsilil)etinil)benceno (4.8)

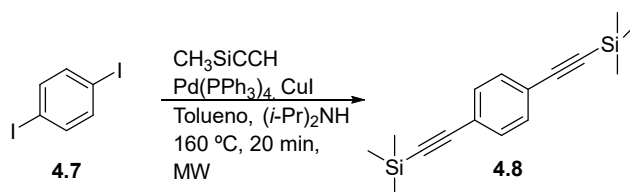


Figura 134. Sustitución del yodo del arilo 4.7 por el etiniltrimetilsilano. Acoplamiento C-C tipo Sonogashira.

En un matraz de microondas se añadieron 1 g (3.03 mmol) de 1,4-diiodobenceno (**4.7**), 0.07 g (0.06 mmol) de $\text{Pd(PPh}_3)_4$ y 0.14 g de CuI (0.74 mmol), se selló el matraz y se eliminó el oxígeno del interior con una corriente de argón. Se añadieron 3 mL de $(i\text{-Pr})_2\text{NH}$ y 7 mL de tolueno y se burbujó argón durante 15 min más. Transcurrido este tiempo se añadieron 1.3 mL (9.1 mmol) de etinil(trimetil)silano y se introdujo la reacción en el reactor microondas durante 20 min a 160 °C. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente, el crudo se suspendió en agua y se extrajo el producto con DCM. La fase orgánica se lavó con agua y con una disolución acuosa saturada de NaCl , se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente obteniéndose un precipitado negro. El precipitado negro obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO_2 , hexano). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido marrón oscuro (0.75 g, 92%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7.38 (s, 4H, Ar), 0.34 (s, 18H, $2 \times \text{Si(CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 131.89 (Ar), 123.27 (Ar), 104.69 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 96.45 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 0.06 (CH_3).

Síntesis del 1,4-dietinilbenceno (4.9)

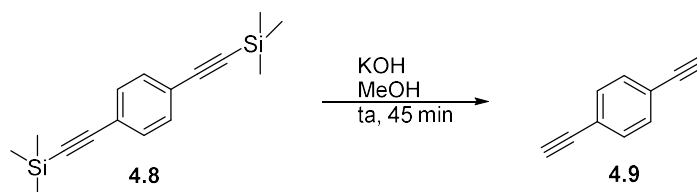


Figura 135. Eliminación del trimetilsilano de 4.8 en medio básico.

2.0 g (7.39 mmol) de 1,4-bis((trimetilsilil)etnil)benceno (**4.8**) se disolvieron en 36 mL de MeOH y se añadieron gota a gota en un matraz de 250 ml sobre una disolución KOH en MeOH (0.71 g en 90 mL). La reacción se dejó con agitación continua a temperatura ambiente durante 45 min. Tras este tiempo se evaporó parte del metanol, se añadieron 50 mL de agua y se extrajo con DCM. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente, obteniéndose un sólido marrón (0.88 g, 94%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 7.44 (s, 4H, Ar), 3.17 (s, 2H, 2xC≡CH).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 132.17 (Ar), 122.69 (Ar), 83.16 (C≡C), 79.22 (C≡C).

Síntesis del 1,4-bis((E)-2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)vinil) benceno (DVB)

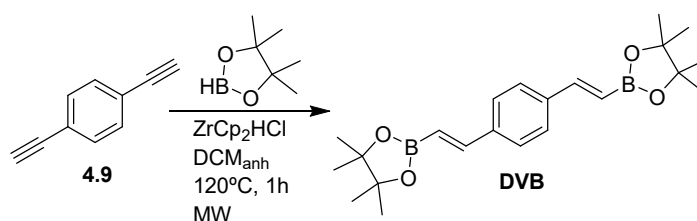


Figura 136. Reducción del triple enlace de 4.9 para la formación del vinilborano DVB empleando el catalizador de Schwartz.

En un vial de microondas se pesaron 51 mg (0.2 mmol) del catalizador de Schwartz y se selló. Se realizó una atmósfera de argón y se añadió 0.8 mL de DCM_{anh} frío. El vial se introdujo en un baño de hielo y se añadieron 1.5 mL de una disolución fría DCM_{anh} que contenía 50 mg (0.4 mmol) de 1,4-dietinilbenceno (**4.9**). Seguidamente se añadieron 0.2 mL (0.24 mmol) de pinacolborano. Se dejó que la reacción alcanzase temperatura ambiente y se introdujo en el reactor de microondas durante 1 h a 120 °C. Transcurrido este tiempo el crudo de reacción se disolvió en Et₂O y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄

anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente obteniéndose un sólido amarillo oscuro. El sólido obtenido se disolvió en una mezcla hexano:AcOEt 9:1 y se filtró a vacío a través de gel de sílice (SiO₂). Finalmente se obtuvo un sólido amarillo (15 mg, 10%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 7.45 (s, 4H, Ar), 7.37 (d, 2H, *J* = 18.40 Hz, 2xCH=CH), 6.17 (d, 2H, *J* = 18.40 Hz, 2xCH=CH), 1.32 (s, 24, 8xBOCCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 148.88 (Ar), 138.15 (CH=CH), 127.46 (Ar), 116.25 (CH=CH), 83.70 (BOCCH₃), 25.02 (BOCCH₃).

Síntesis del 2,6-dibromo-8-fenil-1,3,5,7-tetrametil-4,4'-difluoroboradiza-indaceno (MBDPY)

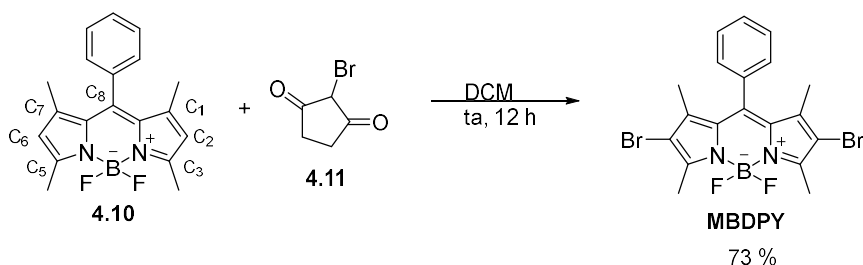


Figura 137. Bromación del bodipy.

En un matraz de 10 mL se introdujeron 15 mg (0.046 mmol) de BODIPY-500 comercial (**4.10**) y 33 mg (0.185 mmol) de la N-bromosuccinimida (**4.11**) disueltos en 2 mL de DCM. La reacción se dejó con agitación continua durante 12 h a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente y el crudo de reacción se purificó por columna de cromatografía (SiO₂, con un gradiente de hexano 100 % a hexano-AcOEt 6%), una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido granate (16.22 mg, 73%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 7.52 (m, 3H, Ar), 7.26 (m, 2H, Ar), 2.60 (s, 6H, 2xCH₃), 1.36 (s, 6H, 2xCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ/ppm: 129.69 (CH), 129.59(CH), 127.91(CH), 13.81(CH₃) 12.36 (CH₃). No se observaron los carbonos cuaternarios.

Síntesis de la 1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-3-(2,5-dibromofenil)urea (MU)

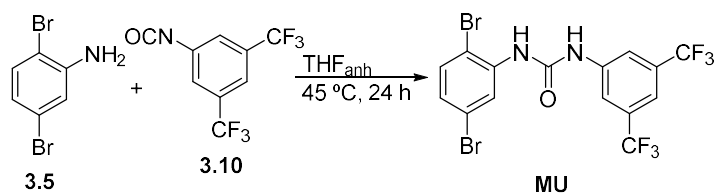


Figura 138. Formación del monómero urea (MU) por reacción entre el isocianato 3.10 y el grupo amino de 2,5-dibromoanilina.

En un matraz de 25 mL de dos bocas provisto de un refrigerante se introdujeron 50 mg de 2,5-dibromoanilina (1.95 mmol) (**3.5**) y 50 mg de 3,5- bis(trifluorometil)fenil isocianato (3.90 mmol) (**3.10**) y se aisló el sistema con argón. Se añadieron 4 mL de THF_{anh} y la reacción se dejó con agitación continua durante 24 h. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente obteniendo un sólido blanco que se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, DCM). Una vez eliminado el disolvente se obtuvo un sólido blanco (52.4 mg, 52%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm: 10.26 (s, NH), 8.44 (s, NH), 8.31 (d, *J* = 2.41 Hz, 1H, BrCCHCNH), 8.10 (s, 2H, 2xHNCCHCCF₃), 7.73 (s, 1H, F₃CCCHCCF₃), 7.62 (d, *J* = 8.54 Hz, 1H, BrCCHCHC), 7.24 (dd, *J* = 8.52 Hz, *J* = 2.39 Hz, 1H, BrCCHCHC).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm: 151.99 (C=O), 145.14 (Ar), 141.21 (Ar), 137.94 (Ar), 134.18 (Ar), 130.62 (Ar), 127.24 (Ar), 124.41 (Ar), 120.74 (Ar), 114.62 (Ar), 112.40 (Ar).

MS-ESI⁺ (CH₃OH): m/z [M+H]⁺ calculado para C₁₅H₉Br₂F₆N₂O⁺ 504.9 encontrado 504.6.

4.2. Síntesis de polímeros

Síntesis del CLP1

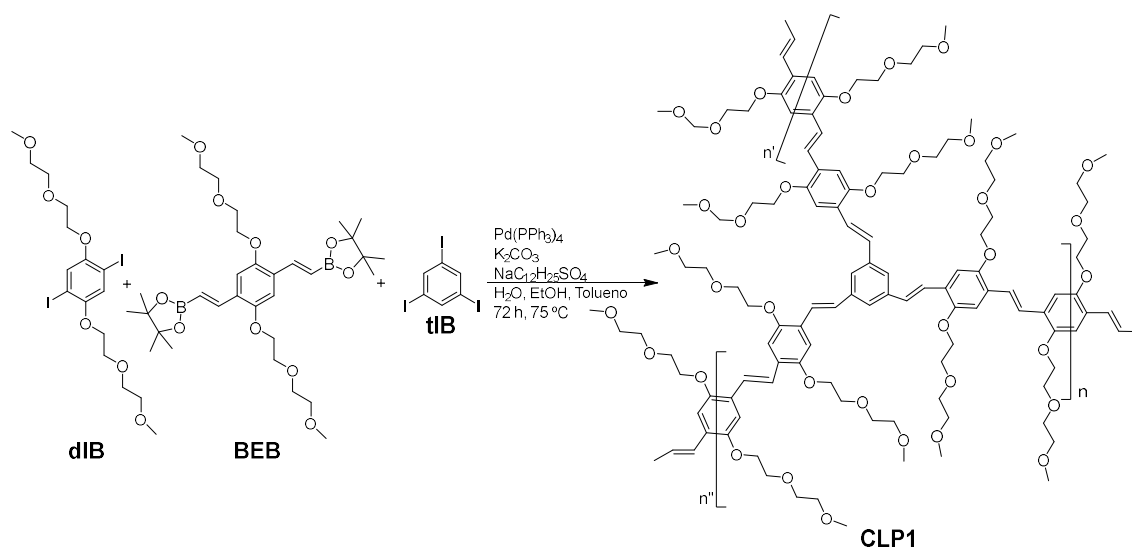


Figura 139. Síntesis de CLP1 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

En un matraz de dos bocas de 25 mL provisto de un refrigerante se introdujeron 8.2 mg (0.0144 mmol) de **dIB**, 20 mg (0.0324 mmol) de **BEB**, 4.5 mg de 1,3,5-triiodobenceno (0.0096 mmol) (**tIB**), 1 mg (9×10^{-4} mmol) de catalizador $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 26.8 mg (0.194 mmol) de K_2CO_3 y 40.8 mg (0.139 mmol) de dodecil sulfato de sodio y se aisló el sistema con argón. Seguidamente se añadió una mezcla de disolventes formada por 10 mL de H_2O , 1 mL de tolueno y 4 mL de etanol, se calentó a 75°C y se dejó con agitación continua vigorosa durante 72 h. Finalizado este tiempo el matraz se sumergió en agua para enfriarlo y se añadieron 15 mL de acetona. La mezcla de reacción se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min, se descartaron las aguas de lavado y se añadieron unos 20 mL agua. Durante 40 min se sonicó la suspensión y se repitió el proceso de centrifugado. Se lavó, sonicó y centrifugó con MeOH y con acetona y finalmente se obtuvo un polvo marrón (11.58 mg), que se molturó y caracterizó por SEM observándose un tamaño de partículas de unos 50 μM .

Síntesis del CLP2a

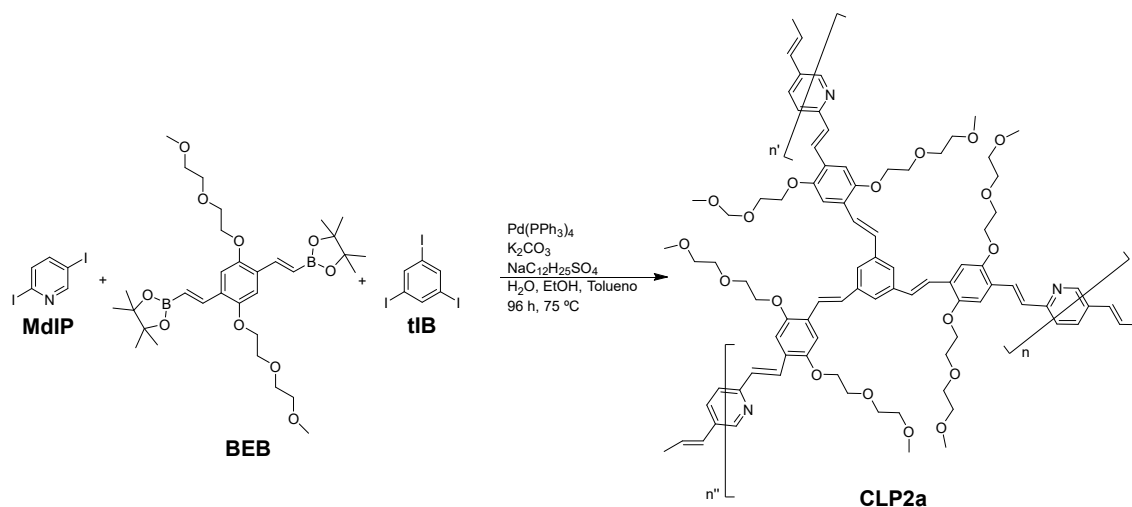


Figura 140. Síntesis de CLP2a mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

Se siguió un proceso similar descrito en la síntesis del **CLP1**. Partiendo de 4.5 mg (0.013 mmol) de **tIB**, manteniendo los mismos equivalentes y sustituyendo el **dIB** por 2,5-diiodopiridina (**MdIP**). Se obtuvieron 6.8 mg de un polvo marrón, que se molturó y caracterizó por SEM observándose un tamaño de partículas de unos 50 μM .

Síntesis del CLP2b

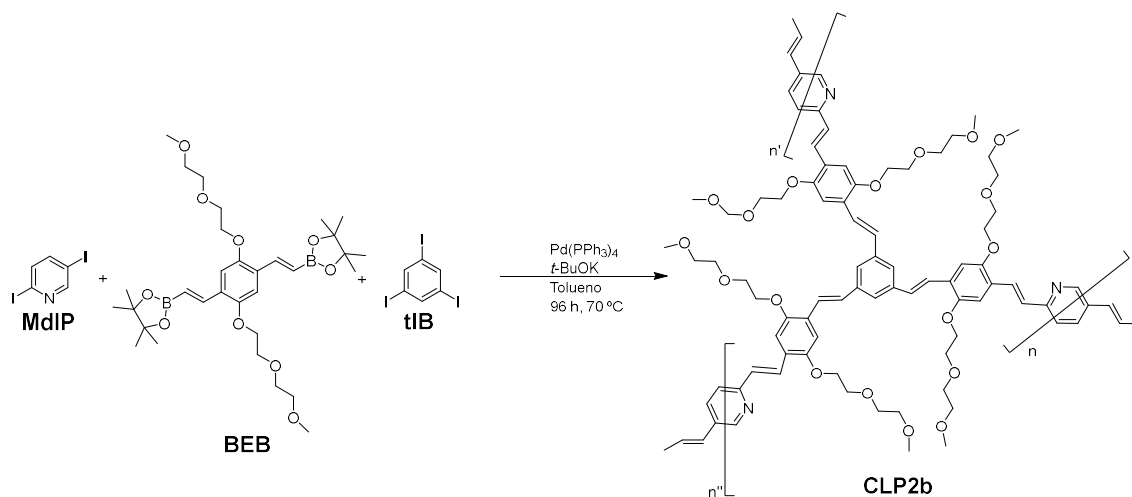


Figura 141. Síntesis de CLP2b mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

Se decidió probar otro método de polimerización y cambiar la polimerización en suspensión por una polimerización por precipitación. Con este cambio se pretendía por un lado obtener partículas de polímero más pequeñas y por otro reducir a uno el número de disolventes, de esta forma se eliminaba el agua y el etanol ambos formadores de enlaces de hidrógeno los cuales

podrían competir con la plantilla a la hora de interactuar con el monómero de reconocimiento para la realización de futuros MIPs.

En un matraz de una boca de 100 mL se introdujeron 4.86 mg (0.0147 mmol) **MdIP**, 20 mg (0.0324 mmol) de **BEB**, 4.5 mg (0.0096 mmol) **tIB**, 11 mg (0.0096 mmol) de catalizador $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 17 mg (0.151 mmol) de *t*-BuOK y 100 mL de tolueno. La mezcla de reacción se burbujeó con argón durante 15 min y se dejó a 75 °C durante 96 h en un agitador orbitálico. Finalizado este tiempo el matraz se sumergió en agua para enfriarlo y se volcó en un matraz de 250 ml donde se añadieron 45 mL de acetona. La mezcla de reacción se dejó durante 1 h en un baño de hielo, consiguiendo la precipitación de pequeñas partículas. Se decantó el disolvente y el precipitado se suspendió en acetona, se sonicó durante 15 min, se centrifugó a 13400 rpm durante 5 min y se eliminaron las aguas de lavado. Este proceso se repitió con agua, MeOH y acetona, obteniéndose finalmente un polvo marrón (11.39 mg), que se molturó y caracterizó por SEM observándose un tamaño de partículas de unos 0.5 μM .

Síntesis del CLP3

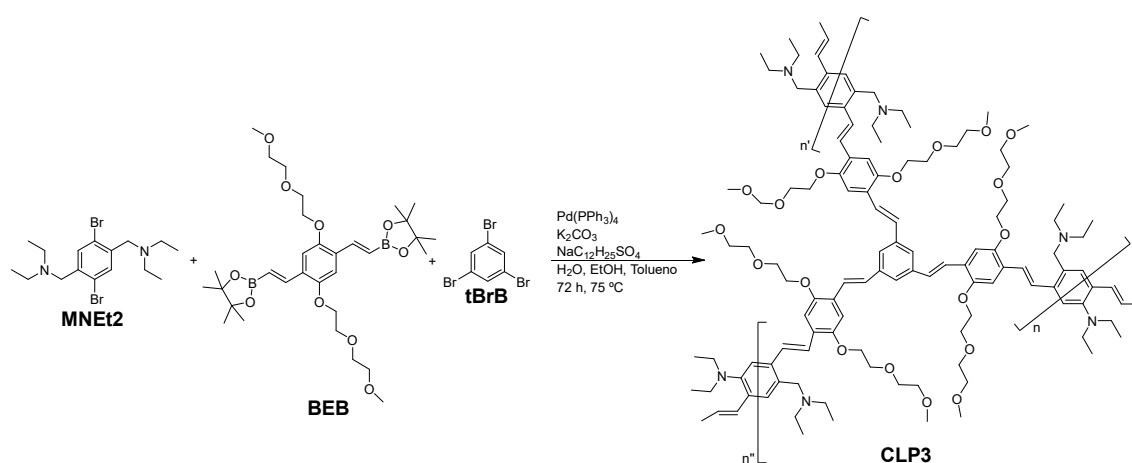


Figura 142. Síntesis de CLP3 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis del **CLP1**. Partiendo de 4 mg (0.0096 mmol) de **tBrB** y manteniendo los mismo equivalentes se obtuvo 13.22 mg de un polvo marrón.

Síntesis del CLP 4

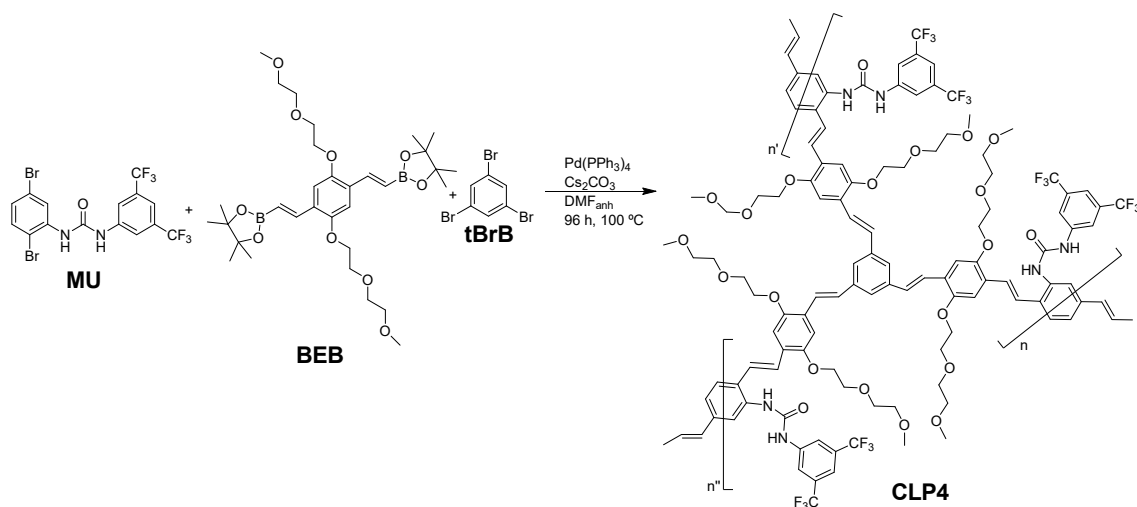


Figura 143. Síntesis de CLP4 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

En un matraz de dos bocas de 25 mL provisto de un refrigerante se introdujeron 9.5 mg (0.0187 mmol) de **MU**, 23.1 mg (0.0375 mmol) de **BEB**, 4.0 mg (0.0125 mmol) de 1,3,5-tribromobenceno (**tBrB**), 1.5 mg ($1.25 \cdot 10^{-3}$ mmol) de Pd(PPh₃)₄ y 40 mg (0.122 mmol) de Cs₂CO₃ y se eliminó el oxígeno de dentro del sistema circulando una corriente de argón durante 15 min. Transcurrido este tiempo se introdujeron 5 mL de DMF_{anh}, se calentó a 100 °C y se dejó con agitación continua durante 96 h. Finalizado este tiempo el matraz se sumergió en agua para enfriarlo y se añadió Et₂O para propiciar la precipitación de las partículas. La mezcla de reacción se trasvasó a diferentes tubos *ependorf* donde se centrifugó a 13400 rpm durante 5 min, se descartaron las aguas de lavado y se añadió agua (pH 3). Durante 15 min se sonicó la suspensión y se repitió el proceso de centrifugado. Se lavó, sonicó y centrifugó con MeOH y Et₂O, finalmente se obtuvo un polvo marrón (8.72 mg).

Síntesis del CLP 5

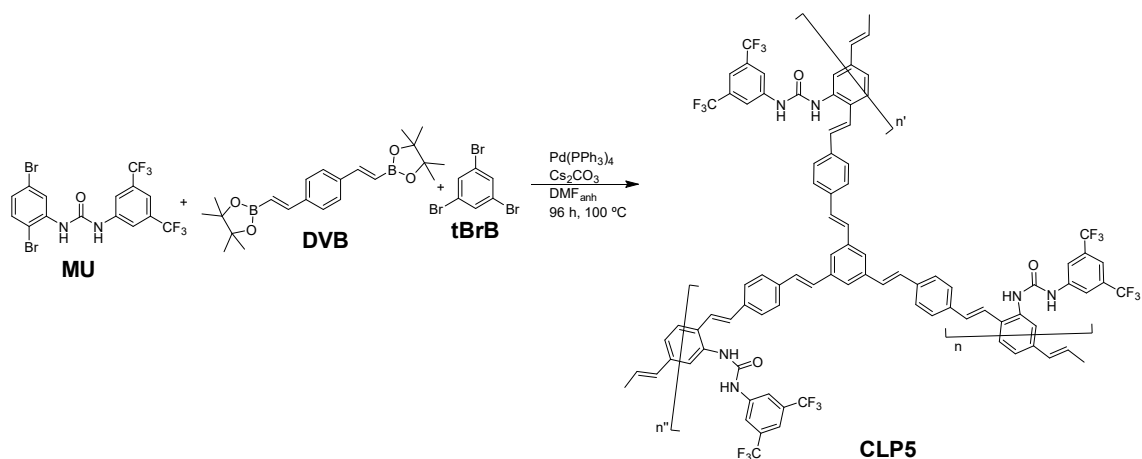


Figura 144. Síntesis del CLP5 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis del **CLP 4** partiendo de 5.4 mg (0.017 mmol) **tBrB** y obteniendo 5.3 mg de un polvo marrón.

Síntesis del CLP 6

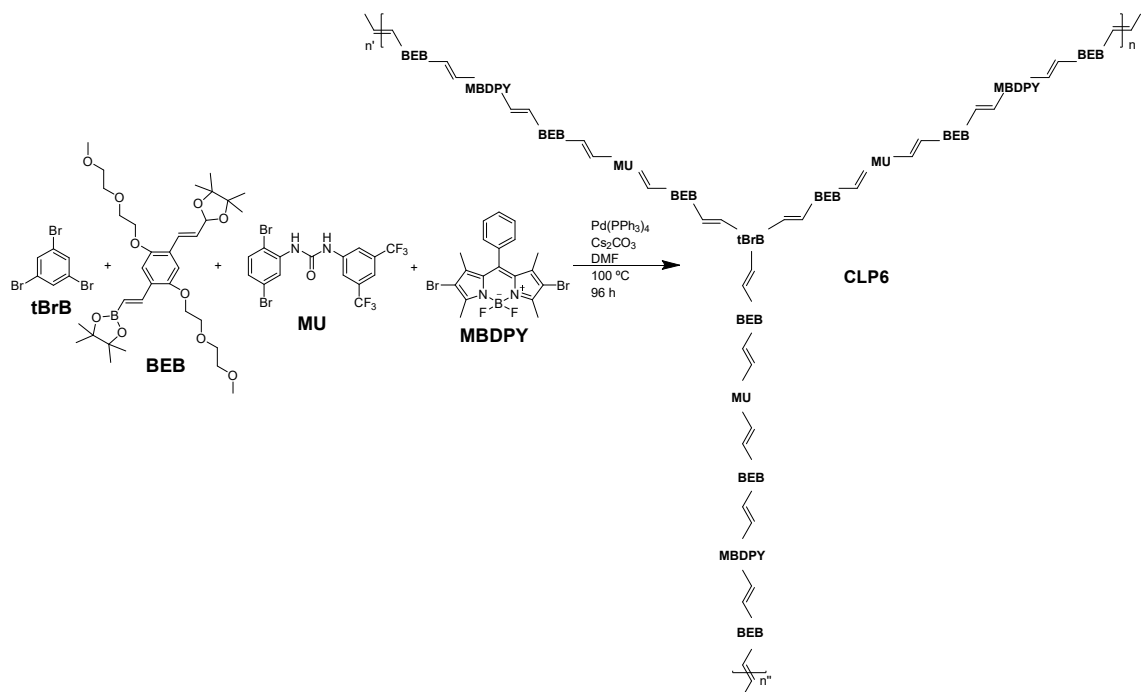


Figura 145. Síntesis del CLP 6 mediante una reacción de acoplamiento C-C tipo Suzuki.

En un matraz de una boca de 10 mL se introdujeron 8.4 mg (0.0165 mmol) de **MU**, 20.4 mg (0.033 mmol) de **BEB**, 7.95 mg (0.0165 mmol) de **MBDPY**, 0.45 mg (1.37 x 10⁻³ mmol) de **tBrB**,

0.2 mg (1.37×10^{-4} mmol) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ y 4.5 mg (0.0137 mmol) de Cs_2CO_3 y 2 mL de DMF_{anh} , se burbujeó con argón la mezcla de reacción durante 15 min y se insertó el refrigerante. La reacción se calentó a 100 °C y se dejó con agitación continua durante 96 h. Finalizado este tiempo el matraz se sumergió en agua para enfriarlo y se añadió éter dietílico para propiciar la precipitación de las partículas. La mezcla de reacción se trasvasó a diferentes un tubos eppendorf donde se centrifugó a 13400 rpm durante 5 min, se descartaron las aguas de lavado y se añadió agua (pH 3). Durante 15 min se sonicó la suspensión y se repitió el proceso de centrifugado. Se lavó, sonicó y centrifugó con MeOH y Et_2O , finalmente se obtuvo un polvo marrón (5.4 mg).

CONCLUSIONES

La innovación principal de esta Tesis es el desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de sensores químicos luminiscentes basados en la amplificación de la señal que ofrecen los polímeros conjugados luminiscentes y en la selectividad en el reconocimiento molecular que aportan los polímeros de impronta molecular. A lo largo de la Tesis, se ha desarrollado una gran variedad de moléculas con diferentes aplicaciones tanto en el campo de MIPs, como en el de sensores químicos ópticos. Si bien no se ha logrado alcanzar el objetivo último -preparación de CLPs con impronta molecular- debido a importantes dificultades sintéticas, sí que se ha podido establecer bases para el desarrollo de futuros CLPs para el reconocimiento de aniones.

En el diseño molecular de los sensores se ha tenido en cuenta las propiedades químicas y estructurales de los analitos de interés: micotoxinas presentes en productos alimentarios como citrinina, fumonisina B₁ u ocratoxina A, cuyo "denominador común" es la presencia de uno o varios grupos ácido carboxílico. Basándonos bien en un reconocimiento mediado por una interacción ácido-base (interacción ácido carboxílico-amina), o bien, por una interacción mediante enlace de hidrógeno (interacción anión carboxilato con grupos urea), se han preparado los siguientes indicadores luminiscentes, todos ellos basados en la estructura básica de la molécula *p*-diestirilbenceno (**DSB**): i) derivados nitrogenados **BSP** (derivado piridínico) y **BSNet₂** (con grupos amino), y sus respectivos CLPs: **CLP2b** y **CLP3**; y ii) derivados tipo urea **BMSU**, **BDSU** y **BPSU**, en los que se ha ido variando la fuerza electródonadora de sustituyentes introducidos en las posiciones 10, 10' y 13, 13' del núcleo común de *p*-diestirilbenceno según el orden: -OMe (**BMSU**) > -H (**BDSU**) > -COOMe (**BPSU**).

Para la síntesis de las moléculas y materiales derivados del **DSB**, se ha recurrido frecuentemente a reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por paladio. Los fluoróforos obtenidos se han caracterizado mediante diversas técnicas de espectroscopía de fluorescencia y técnicas de absorción transitoria con detección ultrarrápida. Se ha intentado establecer una relación estructura química con las propiedades espectroscópicas y la respuesta a aniones.

Por otro lado, una parte importante de esta Tesis ha supuesto la síntesis de moléculas sucedáneas de las micotoxinas citrinina y fumonisina B₁ con dos fines: i) empleo como plantilla para la síntesis de MIPs selectivos, algo que sería impracticable con las propias toxinas naturales por su precio prohibitivo y su toxicidad; y ii) la obtención de derivados fluorescentes que puedan emplearse como sonda en (bio)ensayos competitivos para la detección de micotoxinas.

En concreto, los resultados más relevantes de cada apartado de la Tesis se enumeran a continuación.

Capítulo 2: Síntesis y caracterización de sucedáneos de micotoxinas y marcaje fluorescente

En este capítulo se describe la síntesis de sucedáneos de **fumonisina B₁** y **citrinina**:

- **Mim-FumB₁**: imita la distribución de los 4 ácidos carboxílicos presentes en la FB₁, cuya presencia se considera que es fundamental para el reconocimiento por anticuerpos. El sucedáneo se obtuvo en 4 pasos (rendimiento total 50%), partiendo del ácido tricarbálico. Se determinó su idoneidad como sucedáneo de FB₁ al observar que anticuerpos selectivos a FB₁ eran capaces de reconocer la molécula.
- Por otro lado, se preparó **AVA-ASA** y **BODIPY-AVA-ASA** como sucedáneos de la citrinina. **AVA-ASA** es un derivado del ácido 4-aminosalicílico con un espaciador de 5 carbonos con un término -NH₂ que permite su anclaje covalente a superficies, o bien la conjugación a otras moléculas. En esta Tesis, se describe la síntesis y caracterización de un conjugado fluorescente **BODIPY-AVA-ASA** ($\lambda_{\text{ABS}} / \lambda_{\text{EM}} = 591 / 624 \text{ nm}$, $\Phi_f = 0.193$ en agua) que puede emplearse como marcador para la realización de ensayos competitivos para el análisis de citrinina.

Actualmente, se está trabajando con ambos sucedáneos. La **Mim-FumB₁** se está empleando para la preparación de MIPs para la separación y la detección de la fumonisina B₁. Además, se está llevando a cabo el anclaje covalente sobre microesferas de vidrio silanizadas, tanto del precursor de la **Mim-FumB₁** (compuesto **2.4**) como de **AVA-ASA**, para su aplicación en la síntesis de MIPs en formato de nanogel.

Capítulo 3: Síntesis y caracterización de elementos precursores de CLPs.

En el Capítulo 3 se desarrollaron 5 elementos precursores basados en la estructura del *p*-diestirilbenceno (**DSB**): **BSP** y **BSNet2**, estructuras con carácter básico para el reconocimiento de especies ácidas; y **BMSU**, **BDSU** y **BPSU**, derivados tipo urea para el reconocimiento de grupos carboxilato presentes en las micotoxinas.

- a) En el caso de *elementos precursores sensibles a ácidos*, se observa que, tanto la sustitución del benceno central en **DSB** por piridina (derivado **BSP**), como la introducción de grupos dialquilamino en las posiciones 3 y 6 del núcleo **DSB** (derivado **BSNet2**) apenas altera las propiedades espectroscópicas con respecto al cromóforo de referencia **DSB** (todos los compuestos presentan $\lambda_{\text{ABS}} = 350 \text{ nm}$ y emisión centrada entre 390 y 430 nm). El indicador **BSP** proporciona una respuesta muy débil a la adición de un ácido fuerte como el ácido

trifluoroacético (tan sólo un 20% de desactivación de fluorescencia en presencia de un exceso del ácido); y en el caso de **BSNet2**, para el que se esperaba que la protonación de los grupos dietilamino indujese un aumento en la intensidad de fluorescencia por la inhibición de un proceso fotoinducido de transferencia electrónica, no se observó ningún cambio frente a la adición del TFA.

b) Respecto a los *elementos precursores derivados de urea* para la detección de aniones carboxilato: Los derivados **BMSU** ($R_{10,10',13,13'} = -OMe$), **BDSU** ($R_{10,10',13,13'} = -H$) y **BPSU** ($R_{10,10',13,13'} = -COOMe$) se preparan por condensación del 3,5-bis(trifluorometil)fenil isocianato con el derivado anilina correspondiente: **DMA** ($R_{10,10',13,13'} = -OMe$) para **BMSU**, **DSA** ($R_{10,10',13,13'} = -H$) para **BDSU** y **DPA** ($R_{10,10',13,13'} = -COOMe$) para **BPSU**. Para los derivados urea se espera que la coordinación de un anión al receptor aumente la densidad electrónica, afectando al carácter electrodonador del grupo $-NH$ conjugado a la cadena principal del núcleo **DSB**. Este aumento del carácter electrodonador altera en mayor o menor medida a las propiedades luminiscentes de las sondas, dependiendo del sustituyente $R_{10,10',13,13'}$. Con el objetivo de evaluar la influencia de la fuerza electrodonadora del sustituyente en la posición 3 del **DSB**, también se llevó a cabo un estudio comparativo con los precursores sintéticos anilina de las ureas. Se observa que para:

- $R_{10,10',13,13'} = H$. En esta serie, la tendencia electrodonadora en 3 varía según **DSB** < **BDSU** < **DSA**, observándose una $\lambda_{ABS}^{DSB} / \lambda_{EM}^{DSB} = 349 / 408$ nm, $\Phi_f^{DSB} = 0.70$ y $\tau_F^{DSB} = 1.42$ ns; $\lambda_{ABS}^{BDSU} / \lambda_{EM}^{BDSU} = 349 / 424$ nm, $\Phi_f^{BDSU} = 0.66$; $\tau_F^{BDSU} = 1.54$ ns; y $\lambda_{ABS}^{DSA} / \lambda_{EM}^{DSA} = 375 / 478$ nm, $\Phi_f^{DSA} = 0.44$; $\tau_F^{DSA} = 3.02$ ns. Se pone de manifiesto el mayor carácter electrodonador de la anilina en **DSA** con un desplazamiento batocrómico de la emisión de 70 nm, una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.70 a 0.44 y un aumento del tiempo de vida de emisión de 1.54 a 3.02 ns con respecto al diestirilo no sustituido **DSB**. Este desplazamiento se atribuye a un proceso de transferencia interna de carga (ICT) del par electrónico libre del grupo amino al fluoróforo central. En el caso de la urea **BDSU**, con un grupo electrodonador débil, tenemos una situación intermedia, muy similar a **DSB**, lo que indica que en este caso la ICT está menos favorecida. Al añadir el anión acetato en exceso se observa una importante desactivación de la fluorescencia a 424 nm promovido por la activación de la ICT, que va acompañada de la aparición de una nueva banda ancha y desestructura a *ca.* 625 nm, atribuible a un proceso fotoinducido de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT). Esta nueva banda también se observa tras la adición del anión fluoruro.

- $R_{10,10',13,13'} = -OMe$. En esta serie el proceso ICT parece estar debilitado: $\lambda_{ABS}^{BMSU} / \lambda_{EM}^{BMSU} = 367 / 455$ nm, $\Phi_f^{BMSU} = 0.54$; $\tau_F^{BMSU} = 2.06$ ns; $\lambda_{ABS}^{DMA} / \lambda_{EM}^{DMA} = 388 / 488$ nm, $\Phi_f^{DMA} = 0.46$;

$\tau_F^{DMA} = 2.70$ ns. En este caso hay que resaltar que la introducción de los sustituyentes metóxido dificulta el reconocimiento de los carboxilatos ya que la molécula **BMSU** únicamente responde a la adición del anión más básico (en medio orgánico) F^- . Al introducir grupos electrodadores $-OMe$, la acidez del grupo $-NH$ urea disminuye, debilitando la interacción con los carboxilatos.

- **R_{10,10',13,13'} = -COOMe**. La introducción de grupos electroattractores $-COOMe$ en la estructura afectó de forma significativa a las propiedades ópticas de las moléculas: se observa una disminución drástica del rendimiento cuántico de fluorescencia en ambos casos, **BPSU** ($\Phi_f^{BPSU} = 0.008$) y **DPA** ($\Phi_f^{DPA} = 0.0093$) y de los valores de tiempo de vida media en el estado excitado ($\tau_F^{BPSU} = 0.85$ ns y $\tau_F^{DPA} = 3.35$ (7%), 0.86 (93%) ns). La presencia de los grupos $-COOMe$ favorecen el proceso ICT, desplazando el máximo de emisión hasta 484 nm en el caso de **BPSU** y 515 nm para **DPA**. Esto también provoca un aumento de la acidez del grupo NH en posición 3, con el consecuente aumento en la respuesta óptica y en el valor de las constantes de enlace con acetato: en el caso de **BMSU** no se observa interacción, mientras que $\log K_{BDSU-AcO^-} = 5.21$ y el mayor $\log K$ se obtiene para **BPSU** (5.64). En el caso de **TBHB** (sal del ácido salicílico), un analito empleado como sucedáneo de citrinina, de menor basicidad que el acetato ($pK_a^{TBHB} = 2.5$, vs. $pK_a^{HAcO} = 4.8$), la diferencia en las constantes de enlace con **BDSU** y **BPSU** se pone todavía más de manifiesto: $\log K_{BDSU-TBHB} = 2.73$ vs. $\log K_{BPSU-TBHB} = 3.50$).

Los espectros de absorción transitoria (TAS) para **DSA**, **BDSU**, **DMA** y **BMSU** muestran la formación de un estado excitado singlete S_1 (λ_{exc} 380 nm), con propiedades similares al del **DSB**, responsable de su fluorescencia. En función de la caracterización espectroscópica del estado estacionario, las mediciones de absorción y emisión transitorias y los cálculos TD-DFT se puede concluir que la fotofísica de las moléculas **DSB** sustituidas se rige por las propiedades de los restos **DSB** y, en particular las de **BDSU** y **BMSU**. En los derivados amino, se observa además, una perturbación significativa de la densidad electrónica del grupo arilo central que también involucra al grupo $-NH_2$. La evolución espectral del TAS para la interacción **BDSU-AcO⁻** sugiere una estabilización de la geometría del estado S_1 que no se observa en ausencia de anión. Además, se detecta una nueva banda a >600 nm, que se asigna a la desprotonación de la molécula **BDSU*** debido a un proceso de transferencia protónica ESPT, proceso que compite eficientemente con la desactivación radiativa del estado S_1 . Para la molécula **BMSU** se llevó a cabo el mismo experimento. En este caso, no se produce la desprotonación, y el tiempo vida del estado S_1 no se ve afectado. Aparentemente, el grupo $-OMe$, con fuerte carácter electrodador, estabiliza el conformero enol del grupo urea y la desprotonación no es eficaz.

Capítulo 4: Síntesis y caracterización de polímeros conjugados fluorescentes (CLPs).

En este capítulo se sintetizaron 6 CLPs entrecruzados e insolubles, como una primera aproximación a la elaboración de CLPs improntados y se comparó la respuesta de estos con sus elementos precursores homólogos descritos en el capítulo 3:

- **CLP1**: polímero conjugado luminiscente análogo a **DSB**. Se utiliza como referencia.
- **CLP2b**: polímero conjugado luminiscente con grupos piridina. Se observa una mejoría en la respuesta respecto al bloque precursor **BSP**. En el caso del **CLP2b** se produce una desactivación de la fluorescencia del 50% tras la adición de un exceso de TFA frente al escaso 20% en el caso de **BSP**.
- **CLP3**: al igual que su bloque precursor **BSNet2** no ofreció respuesta a la adición de TFA.
- **CLP4** y **CLP5**: polímeros conjugados luminiscentes derivados de urea. Para **CLP4**, $R_{10,10',13,13'}$ es $-OMe$, en analogía a **BDSU** ($R_{10,10',13,13'} = -OMe$) y para **CLP5**, $R_{10,10',13,13'} = -H$, al igual que **BDSU**. **CLP4** y **CLP5** presentaron una respuesta muy similar o algo inferior a sus elementos precursores homólogos. Se observó que la adición de grupos electrodoadores $-OMe$ de carga disminuía la respuesta. Desafortunadamente, y a pesar de repetidos intentos, no se logró sintetizar con polímero con grupos electroattractores $R_{10,10',13,13'} = -COOMe$ para poder completar el estudio.
- En el caso de **CLP4** y **CLP5** se observan cambios bruscos en la señal fluorescente tras la valoración con aniones. Esto puede ser debido a problemas de difusión de los analitos a través de la red entrecruzada del polímero, lo que también podría estar afectando a que la sensibilidad observada de los CLPs sea menor de lo esperada. A este respecto, la elaboración de CLPs en formatos como nanoesferas o película delgada con una mayor superficie específica, podría ayudar a la mejora de la sensibilidad.
- **CLP6**: polímero conjugado con unidades BODIPY que se preparó con el objetivo de disponer de materiales luminiscentes con emisión en la zona roja del espectro. El polímero obtenido sin embargo no presentó fluorescencia, por lo que finalmente se descartó su uso.

CONCLUSIONS

The main innovation of this Thesis work is the description of new strategies for the development of luminescent chemosensors based in the signal amplification offered by luminescent conjugated polymers and the selectivity on recognition provided by molecularly imprinted polymers. Along this Thesis, several molecules have been synthesised for their application in the field of MIPs and in the area of optical chemosensors. Although, the ultimate aim could not be reached -the preparation of CLPs with molecular imprinting- due to important complications in the synthesis, we could establish an important basis for the development of CLPs for anion recognition.

In the molecular design of the chemosensors we have been taking into account the chemical and structural properties of the target analytes: mycotoxins present in food products such as citrinine, fumonisine B₁ or ochratoxin A, which have in common the presence of one or several carboxylic acid groups. Taking advantage of either an acid-base interaction (carboxylic acid-amine interaction), or hydrogen bonding (carboxylate anion-urea interaction), the next luminescent indicators have been prepared, all of them based in the main structure of the *p*-distyrylbenzene (**DSB**) molecule: i) nitrogenated derivatives **BSP** (pyridine derivative) and **BSNet₂** (with alkyl-amino groups), and the corresponding CLPs: **CLP2b** and **CLP3**; and ii) urea derivatives **BMSU**, **BDSU** and **BPSU**, in which the electron donor strength of substituents introduced in the 10, 10' and 13, 13' of the shared nucleus *p*-diestrylbenzene has been varied according to the trend: -OMe (**BMSU**) > -H (**BDSU**) > -COOMe (**BPSU**).

For the synthesis of molecules and materials sharing the **DSB** nucleus, we have frequently followed C-C coupling reactions catalyzed by palladium synthetic paths. The obtained fluorophores have been characterized by different fluorescence spectroscopy techniques and also by transient absorption with ultrafast detection. We have tried to establish a relationship between the chemical structure, the spectroscopic properties, and the response to anions.

Another important part of this Thesis has been devoted to the preparation of molecular surrogates or mimics of the citrinin and fumonisine B₁ mycotoxins, with two aims: i) their use as molecular template for the synthesis of selective MIPs, something unaffordable with the natural toxins due to their prohibitive price and their toxicity; and, ii) obtaining fluorescent derivatives that could be employed as molecular probes in competitive (bio)assays for mycotoxin detection.

Briefly, the most relevant results for each Chapter are listed below.

Chapter 2: Synthesis and characterization of mycotoxin surrogates and fluorescent labelling.

This chapter describes the synthesis of **fumonisine B₁** and **citrinin** surrogates:

- **Mim-FumB₁**: mimics the distribution of the 4 carboxylic acids present in FB₁, whose presence is considered to be fundamental for the recognition by antibodies. The surrogate was obtained in 4 synthetic steps (total yield 50%), starting from the tricarballic acid. Its suitability as molecular mimic for FB₁ was corroborated with a bioassay where it was observed that selective antibodies for FB₁ could recognize and bind the molecule.
- On the other hand, **AVA-ASA** and **BODIPY-AVA-ASA** molecules were prepared as citrinin surrogates. **AVA-ASA** is a derivative of the 4-aminosalicylic acid, with a 5 carbon spacer with a terminal –NH₂ group that allows either its covalent grafting onto surfaces, or the conjugation to other molecules. In this Thesis, we describe the synthesis and spectroscopic characterization of a fluorescent conjugate **BODIPY-AVA-ASA** with $\lambda_{\text{ABS}} / \lambda_{\text{EM}} = 591 / 624 \text{ nm}$ and $\Phi_f = 0.193$ in water, that can be employed as label in competitive assays for citrinin analysis.

Currently, the group is working with both surrogates. **Mim-FumB₁** is being used in the development of MIPs for the separation and detection of fumonisin B₁. In addition, covalent anchoring on silanized glass microspheres of the precursor of **Mim-FumB₁** (compound **2.4**) and **AVA-ASA** is being carried out for their application in the synthesis of MIPs in nanogel format.

Chapter 3: Synthesis and characterization of building block for CLPs.

In Chapter 3, five building blocks based in the *p*-diethylbenzene skeleton have been prepared: **BSP** and **BSNet2**, structures with a basic character for the recognition of acidic species; and **BMSU**, **BDSU** and **BPSU**, three urea derivatives for the recognition of carboxylate groups present in the mycotoxins.

- a) In the case of building blocks sensitive to acids, it was observed that, both, the exchange of the central benzene ring in **DSB** by pyridine (**BSP** derivative), and the introduction of dialkylamino groups in the 3 and 6 position of the **DSB** nucleus (**BSNet2** derivative) barely affects the spectroscopic properties with respect to the reference chromophore **DSB** (all compounds present $\lambda_{\text{ABS}} = 350 \text{ nm}$ and emission centered at between 390 and 430 nm). The **BSP** indicator provides a very weak response to the addition of a strong acid such as trifluoroacetic acid (just a 20% of fluorescence quenching in the presence of an excess of acid); and, in the case of **BSNet2** (for who protonation of the diethylamino groups could

induce an increase of the fluorescence intensity due to the inhibition of a photoinduced electron transfer process), no change could be observed vs. addition of **TFA**.

b) With respect to the urea building blocks for the detection of carboxylate anions: **BMSU** ($R_{10,10',13,13'} = -\text{OMe}$), **BDSU** ($R_{10,10',13,13'} = -\text{H}$) and **BPSU** ($R_{10,10',13,13'} = -\text{COOMe}$) derivatives were prepared by condensation between 3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl isocyanate and the corresponding aniline derivative: **DMA** ($R_{10,10',13,13'} = -\text{OMe}$) for **BMSU**, **DSA** ($R_{10,10',13,13'} = -\text{H}$) for **BDSU** and **DPA** ($R_{10,10',13,13'} = -\text{COOMe}$) for **BPSU**. For the urea derivatives, it is expected that anion coordination to the receptor will increase the electron density, influencing the electron donor character of the conjugated $-\text{NH}$ group. The increase of the electron donor character influences in a different degree the luminescent properties of the probes, depending on the $R_{10,10',13,13'}$ substituent. With the aim of evaluating the influence of the electron donor strength of the substituent in position 3 of the **DSB** nucleolous, also a comparative study was carried out with the aniline synthetic precursors of the ureas. It was observed that for:

- $R_{10,10',13,13'} = \text{H}$. In this series, the electron donor strength in position 3 varies according to: **DSB** < **BDSU** < **DSA**, observing a $\lambda_{\text{ABS}}^{\text{DSB}} / \lambda_{\text{EM}}^{\text{DSB}} = 349 / 408 \text{ nm}$, $\Phi_f^{\text{DSB}} = 0.70$ y $\tau_f^{\text{DSB}} = 1.42 \text{ ns}$; $\lambda_{\text{ABS}}^{\text{BDSU}} / \lambda_{\text{EM}}^{\text{BDSU}} = 349 / 424 \text{ nm}$, $\Phi_f^{\text{BDSU}} = 0.66$; $\tau_f^{\text{BDSU}} = 1.54 \text{ ns}$; y $\lambda_{\text{ABS}}^{\text{DSA}} / \lambda_{\text{EM}}^{\text{DSA}} = 375 / 478 \text{ nm}$, $\Phi_f^{\text{DSA}} = 0.44$; $\tau_f^{\text{DSA}} = 3.02 \text{ ns}$. These values show the stronger electron donor character of the aniline in **DSA** with a bathochromic shift in the emission of 70 nm, a decrease in the fluorescence quantum yield from 0.70 to 0.44 and an increase in the emission lifetime from 1.54 to 3.02 ns with respect to the non-substituted distyryl **DSB**. These changes are attributed to a photoinduced internal charge transfer process (ICT) from the free electron pair of the amino group to the central fluorophore. In the case of the **BDSU** urea, with a weak electron donor group, we have an intermediate situation, very similar to that of **DSB**, indicating that, in this case, ICT is less favored. Upon addition of an excess of the acetate anion to **BDSU**, an important deactivation of the fluorescence at 424 nm is observed promoted by the enhancement of the ICT process, together with the formation of a new broad and structureless band at *ca.* 625 nm, attributed to a photoinduced excited state proton transfer (ESPT) process. This new band is also observed after the addition of the fluoride anion.
- $R_{10,10',13,13'} = -\text{OMe}$. In this series, the ICT process seem to be weakened: $\lambda_{\text{ABS}}^{\text{BMSU}} / \lambda_{\text{EM}}^{\text{BMSU}} = 367 / 455 \text{ nm}$, $\Phi_f^{\text{BMSU}} = 0.54$; $\tau_f^{\text{BMSU}} = 2.06 \text{ ns}$; $\lambda_{\text{ABS}}^{\text{DMA}} / \lambda_{\text{EM}}^{\text{DMA}} = 388 / 488 \text{ nm}$, $\Phi_f^{\text{DMA}} = 0.46$; $\tau_f^{\text{DMA}} = 2.70 \text{ ns}$. In this case, we must point out that the introduction of the methoxide substituents hamper carboxylate recognition, since the **BMSU** molecule only responds to

the addition of fluoride, a more basic anion in organic media. Upon introduction of electron donor –OMe groups, the acidity of the -urea –NH group decreases, inhibiting the interaction with the carboxylates.

- **R_{10,10',13,13'} = –COOMe**. The introduction of the –COOMe electron acceptor groups in the structure affected in a significant way the optical properties of the molecules. A drastic decrease in the quantum yield of fluorescence is observed, in both cases, **BPSU** ($\Phi_f^{\text{BPSU}} = 0.008$) and **DPA** ($\Phi_f^{\text{DPA}} = 0.0093$), and in the values of the emission lifetime ($\tau_f^{\text{BPSU}} = 0.85$ ns and $\tau_f^{\text{DPA}} = 3.35$ (7%), 0.86 (93%) ns). The presence of the –COOMe groups favors the ICT process, shifting the emission maximum to 484 nm in the case of **BPSU** and 515 nm for **DPA**. This also provokes an increase of the acidity of the NH group in position 3, with the consequent increase in the optical response and in the value of binding constants with acetate: in the case of **BMSU**, no interaction was observed, while $\log K_{\text{BDSU-AcO}^-}$ is 5.21 and the largest value is obtained for **BPSU** ($\log K_{\text{BPSU-AcO}^-} = 5.64$). In the case of the target **TBHB** (salt of the salycilic acid), employed as a citrinin surrogate, less basic than the acetate anion ($\text{p}K_a^{\text{TBHB}} = 2.5$, vs. $\text{p}K_a^{\text{HAcO}} = 4.8$), the difference in the binding constant values for **BDSU** and **BPSU** is even larger: $\log K_{\text{BDSU-TBHB}} = 2.73$ vs. $\log K_{\text{BPSU-TBHB}} = 3.50$).

The transient absorption spectra (TAS) of **DSA**, **BDSU**, **DMA** and **BMSU** show the formation of a singlet excited state S_1 (λ_{exc} 380 nm), with similar properties as for **DSB**, who is the responsible for their fluorescence. Taking into account the spectroscopic characterization of the steady state, the transient absorption and emission measurements and the TD-DFT calculations, it can be concluded that the photophysics of the **DSB** analogues is governed by the properties of the **DSB** moiety, in particular, for **BDSU** and **BMSU**. In the case of the amino derivatives, a significant perturbation of the electron density of the central aryl group is also observed, which also involves the –NH₂ group. The spectral evolution of the TAS for the **BDSU-AcO⁻** interaction suggests a stabilization of the S_1 state geometry that is not observed in the absence of the anion. In addition, a new band at >600 nm is detected, which is assigned to the deprotonation of the **BDSU*** molecule due to a proton transfer process, ESPT. This process competes efficiently with the radiative deactivation of the S_1 state. The same experiment was carried out for the **BMSU** molecule. In this case, however, the deprotonation does not take place, and the life time of the S_1 state is not affected. The group –OMe, with a strong electrodonating character, stabilizes the enol conformer of the urea group and the deprotonation is not efficient.

Chapter 4: Synthesis and characterization of conjugated polymers (CLPs).

In this chapter, 6 cross-linked CLPs were prepared, as a first approach for the elaboration of molecularly imprinted CLPs. The response of the CLPs was compared with the corresponding analogous building block described in Chapter 3.

- **CLP1**: analogous CLP to **DSB**. Employed just as a reference.
- **CLP2b**: CLP with pyridine groups. An improvement in the response is observed with respect to the **BSP** building block. In the case of **CLP2b** a quenching of the fluorescence of 50% is observed after the addition of an excess of TFA, vs. less than 20% of quenching in the case of **BSP**.
- **CLP3**: as in the case of the **BSNet2** molecule, no response was observed upon addition of TFA.
- **CLP4** and **CLP5**: urea derivatives. For **CLP4**, $R_{10,10',13,13'}$ is $-\text{OMe}$, analogously to **BDSU** ($R_{10,10',13,13'} = -\text{OMe}$); for **CLP5**, $R_{10,10',13,13'} = -\text{H}$, as for **BPSU**. **CLP4** and **CLP5** presented a very similar response or slightly weaker to their molecular building blocks. It was observed that the addition of electron donor groups weakened the response. Unfortunately, and despite several tries, we were not able to synthesise a polymer with electron acceptor groups ($R_{10,10',13,13'} = -\text{COOMe}$).
- In the case of **CLP4** and **CLP5** there are abrupt changes in the fluorescence signal upon titration with anions. This could be due to analyte diffusion problems through the highly crossed-linked matrix of the polymers. In this respect, the preparation of CLPs in nanosphere format or thin-film with a larger specific surface, could be an improvement.
- **CLP6**: CLP with BODIPY units prepared with the aim of having a CLP with red emission. The obtained polymer however was non-fluorescent therefore, its use was finally discarded.

ANEXO I: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Derivados de micotoxinas

Ácido propano-1,2,3-tricarbóxico (1,2-anhídrido) (2.2)

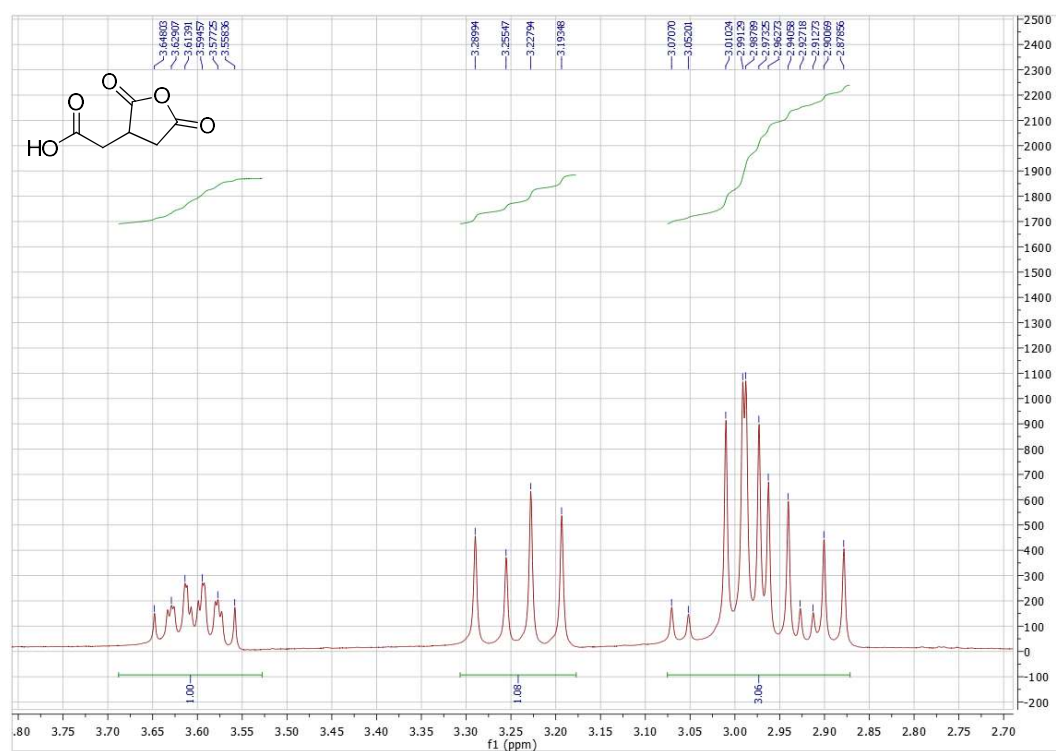


Figura 146. ¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₃CO) del ácido propano-1,2,3-tricarbóxico (1,2-anhídrido). Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

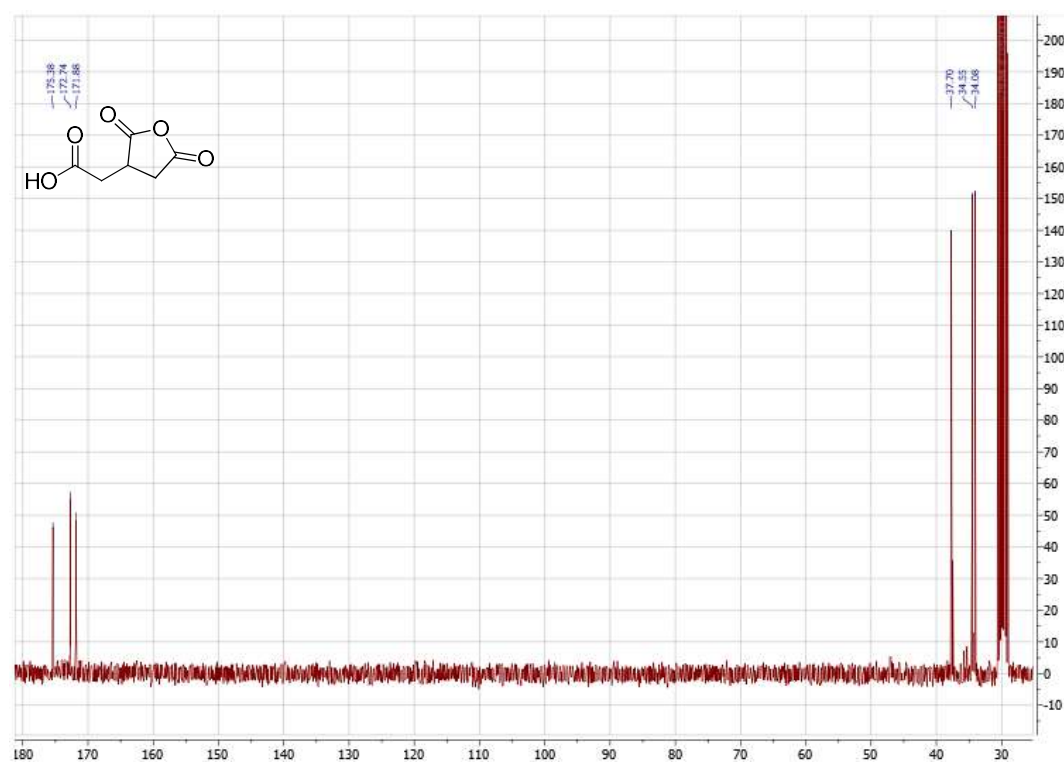


Figura 147. ¹³C-RMN (75 MHz, (CD₃)₃CO) del ácido propano-1,2,3-tricarbóxico (1,2-anhídrido). Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

Anhídrido 1-(clorofornil)propano-2,3-dicarboxílico (2.3)

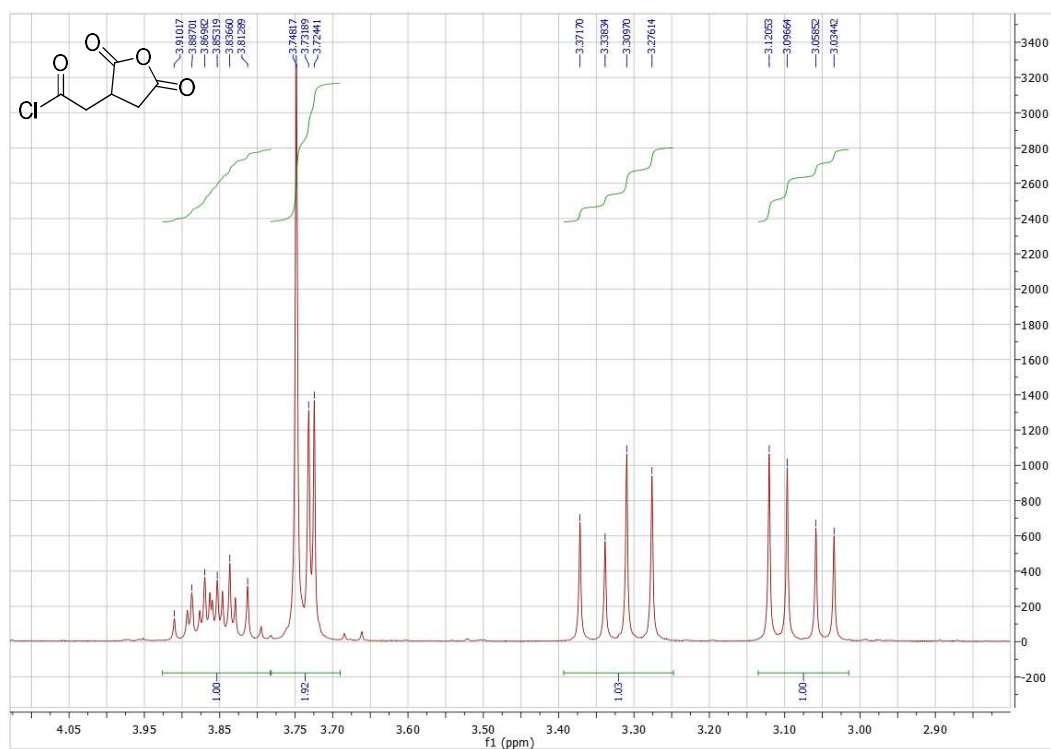


Figura 148. ^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_3\text{CO}$) del anhídrido 1-(clorofornil)propano-2,3-dicarboxílico. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

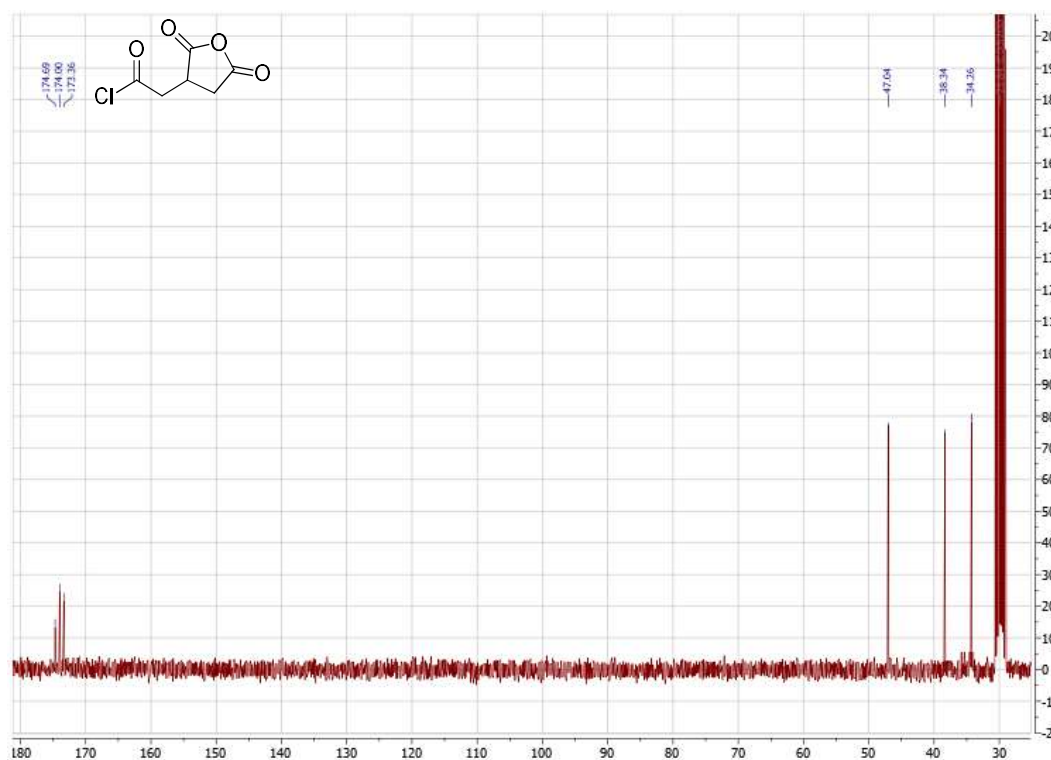


Figura 149. ^{13}C -RMN (75 MHz, $(\text{CD}_3)_3\text{CO}$) del anhídrido 1-(clorofornil)propano-2,3-dicarboxílico. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

N,N'-(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahydrofuran-3-il)-N-etilacetamida (2.4)

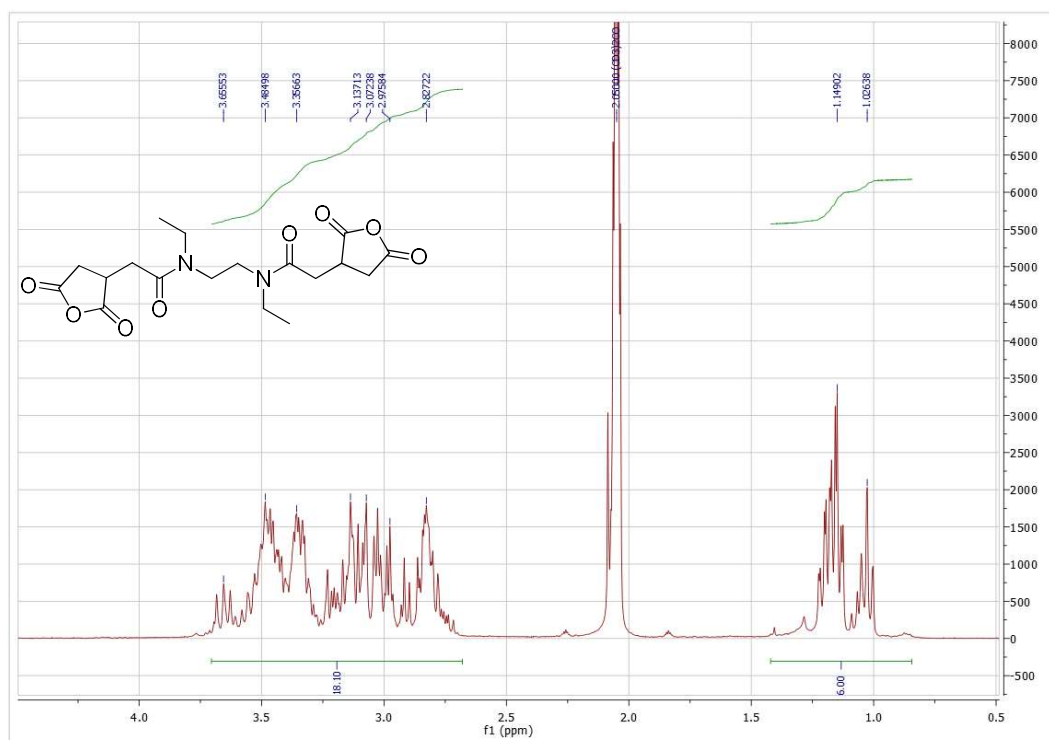


Figura 150. ¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₃CO) del N,N'-(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahydrofuran-3-il)-N-etilacetamida. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

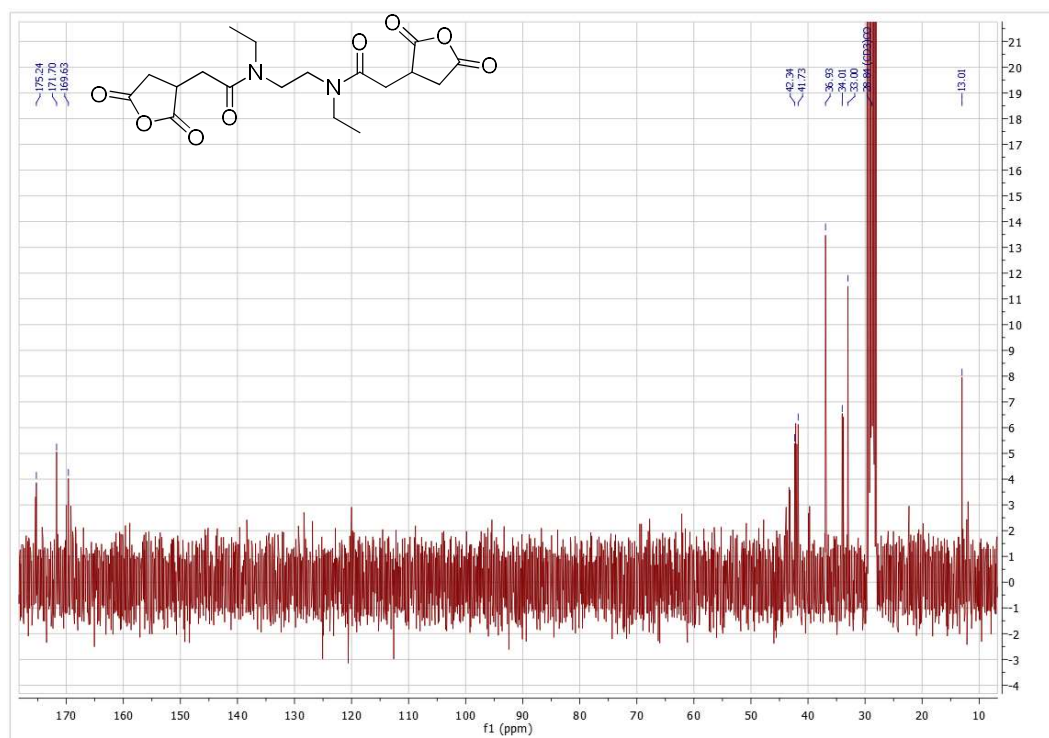


Figura 151. ¹³C-RMN (75 MHz, (CD₃)₃CO) del N,N'-(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahydrofuran-3-il)-N-etilacetamida. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

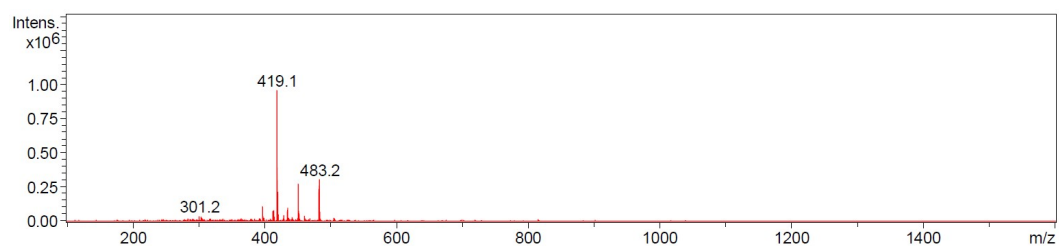


Figura 152. Espectro de masas del N,N'-(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahidrofuran-3-il)-N-etilacetamida, realizado por electroespray en modo positivo. $[M+Na]^+$ calculado para $C_{18}H_{24}N_2O_8Na^+$ 419.14 encontrado 419.1. Además se observan dos picos más correspondientes a $[M+CH_3OH+Na]^+$ 451.1 y $[M+2CH_3OH+Na]^+$ 483.2. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

Ácido 2,2'-((etano-1,2-diilbis(etilazanedil))bis(2-oxoetano-2,1-diol))disuccinico (Mim-FumB₁)

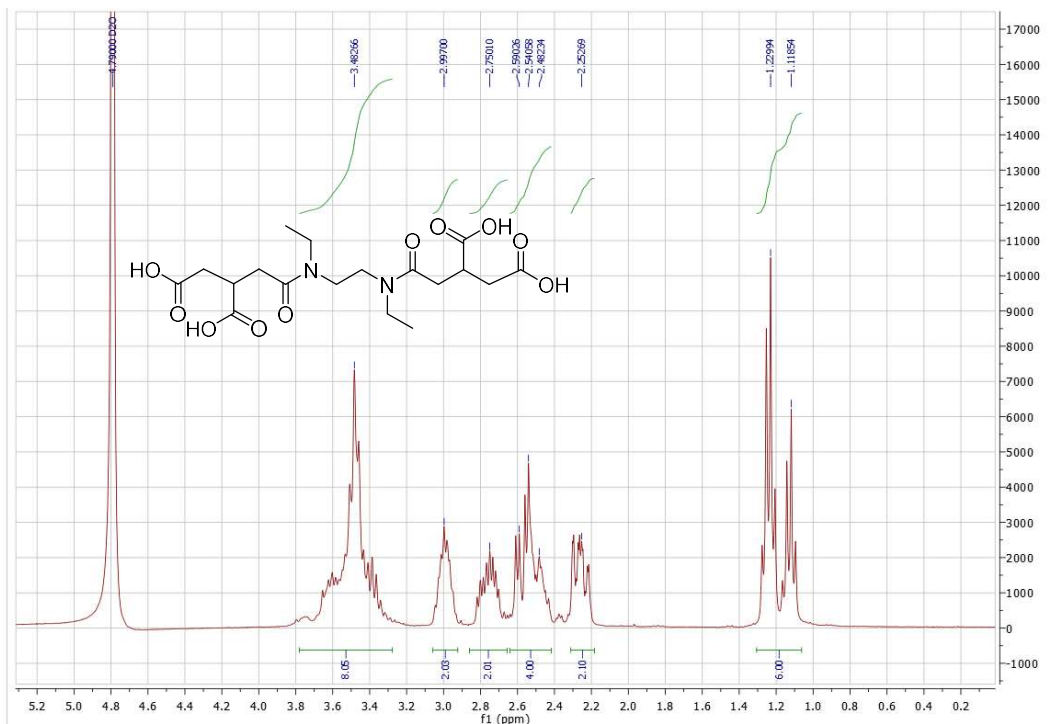


Figura 153. ^1H -RMN (300 MHz, D_2O) del N,N'-(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahidrofuran-3-il)-N-etilacetamida). Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

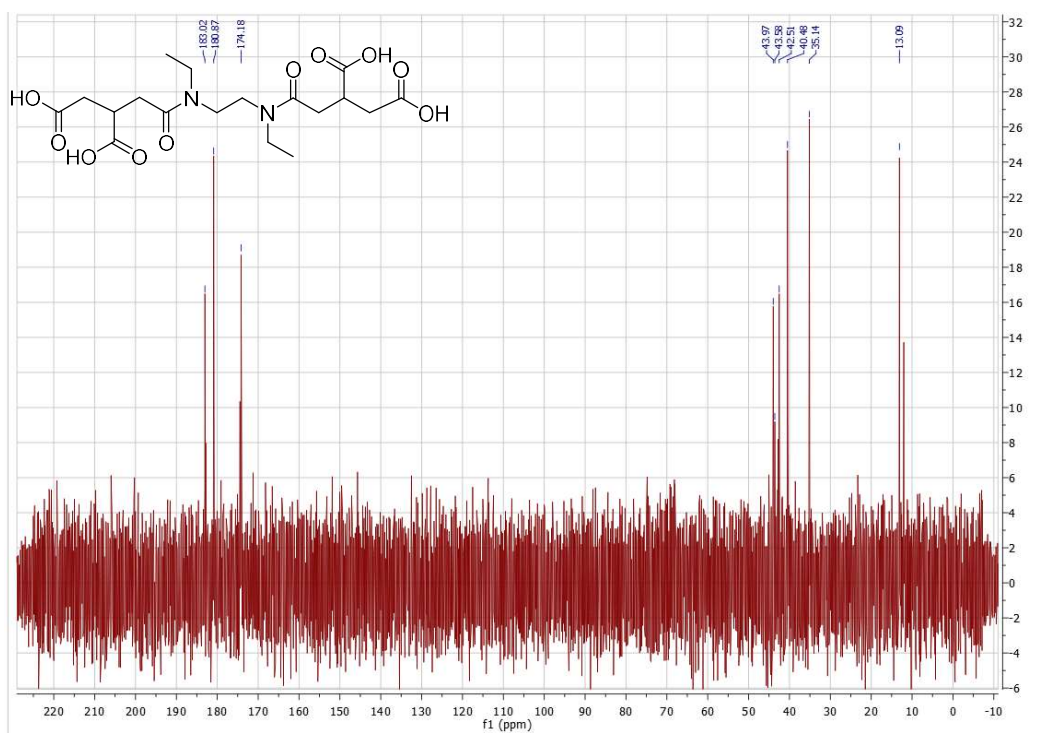


Figura 154. ^{13}C -RMN (75 MHz, D_2O) del N,N'-(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahidrofuran-3-il)-N-etilacetamida. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

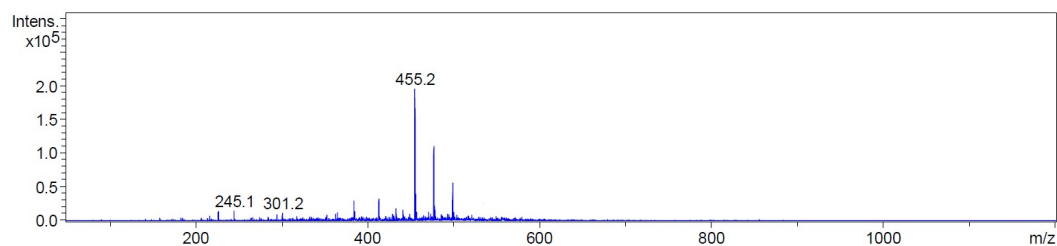


Figura 155. Espectro de masas del N,N'-(etano-1,2-diil)bis(2-(2,5-dioxotetrahidrofuran-3-il)-N-etilacetamida realizado por electrospray en modo positivo. $[M+Na]^+$ calculado para $C_{18}H_{28}N_2O_{10}Na^+$ 455.16 encontrado 455.2. Además se observan dos picos más correspondientes a $[M+2Na]^+$ 477.2 y $[M+3Na]^+$ 499.2. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.1.

Ácido 4-(5-((*tert*-butoxicarbonil)amino)pentanamido)-2-hidroxybenzoico (2.7)

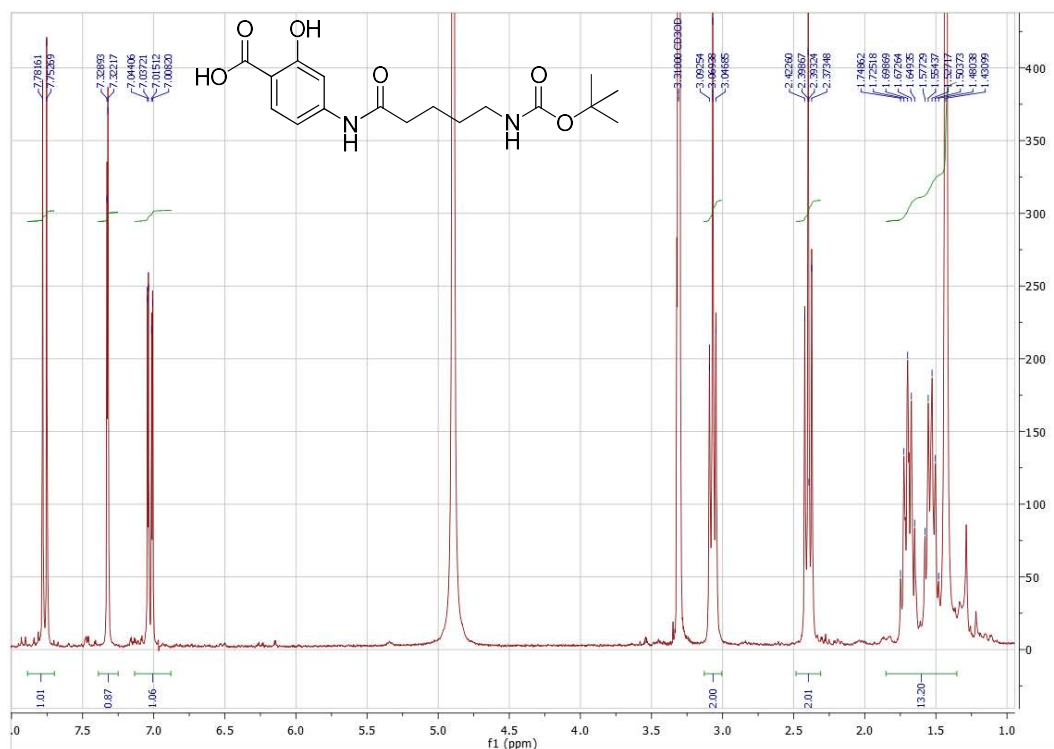


Figura 156. ^1H -RMN (300 MHz, CD_3DO) del BOC-AVA-ASA. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.2.

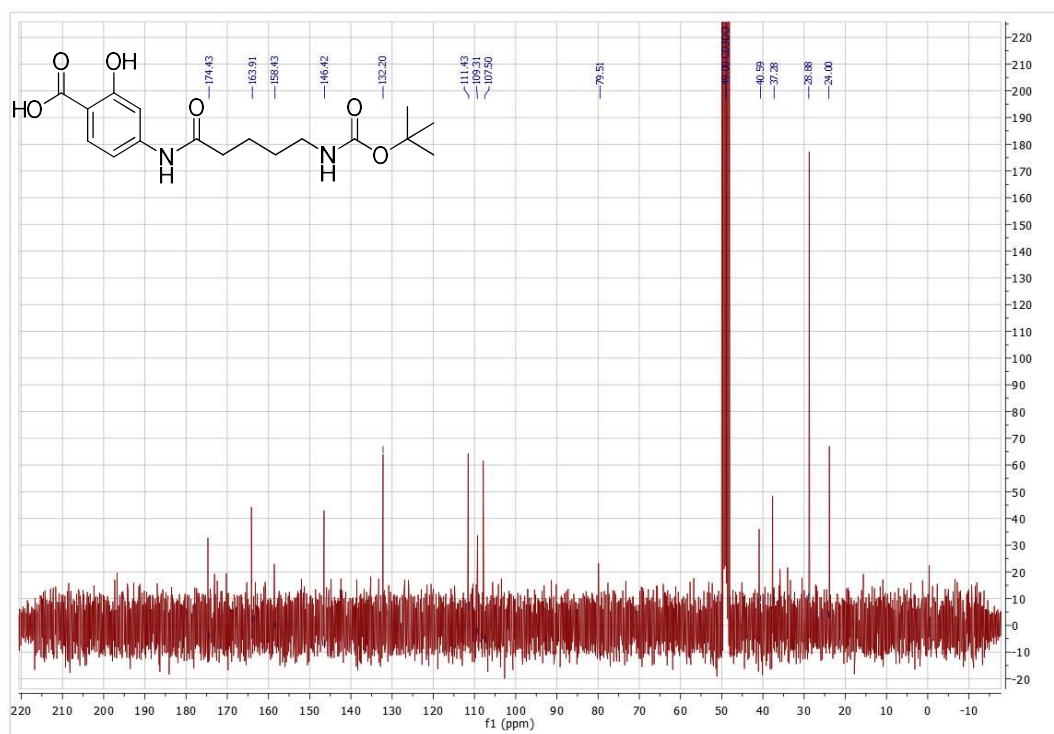


Figura 157. ^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3DO) del BOC-AVA-ASA. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.2.

Síntesis del trifluoroacetato 5-((4-carboxi-3-hidroxifenil)amino)-5-oxopentan-1-amonio de (AVA-ASA)

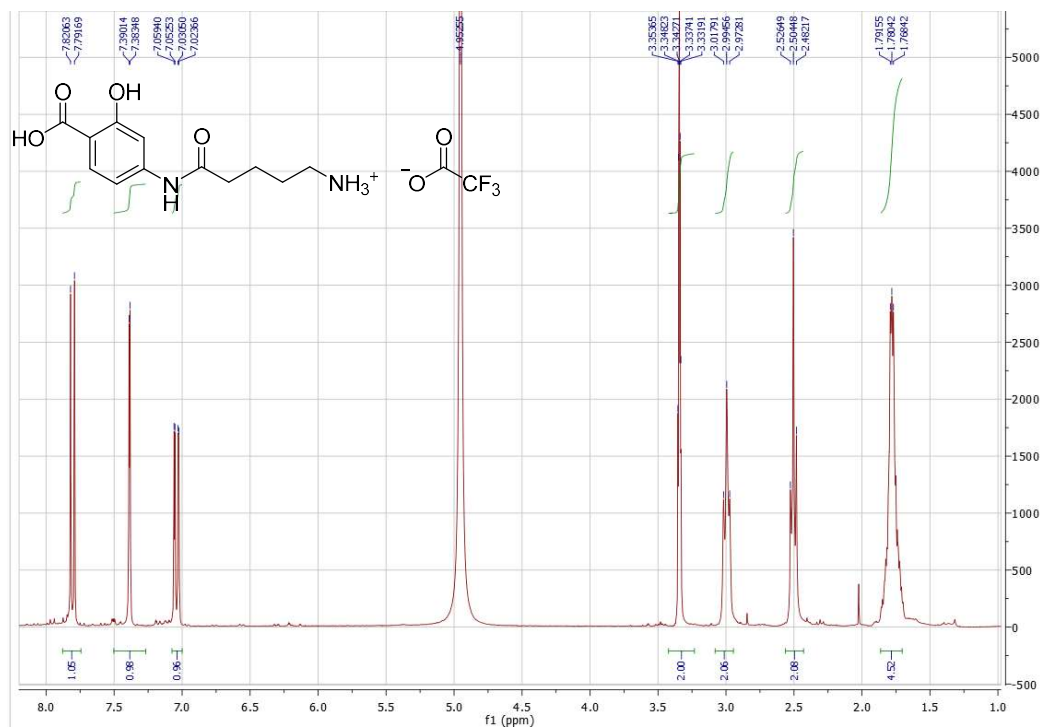


Figura 158. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃DO) del AVA-ASA. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.2.

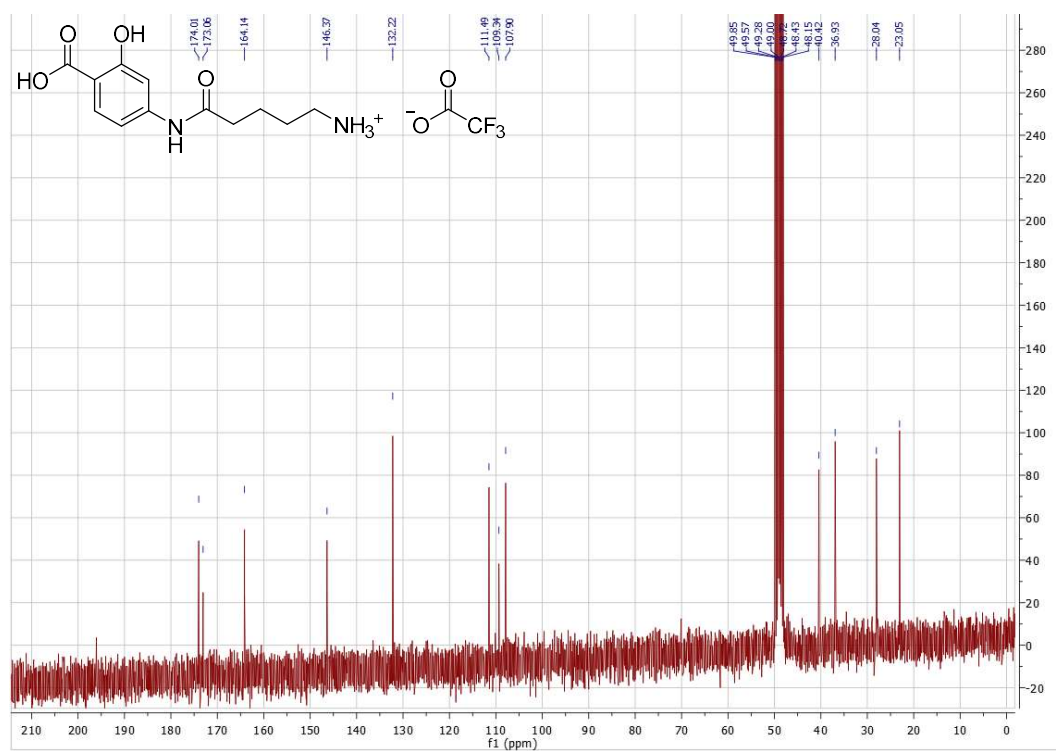


Figura 159. ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃DO) del AVA-ASA. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.2.

Síntesis BODIPY-AVA-ASA

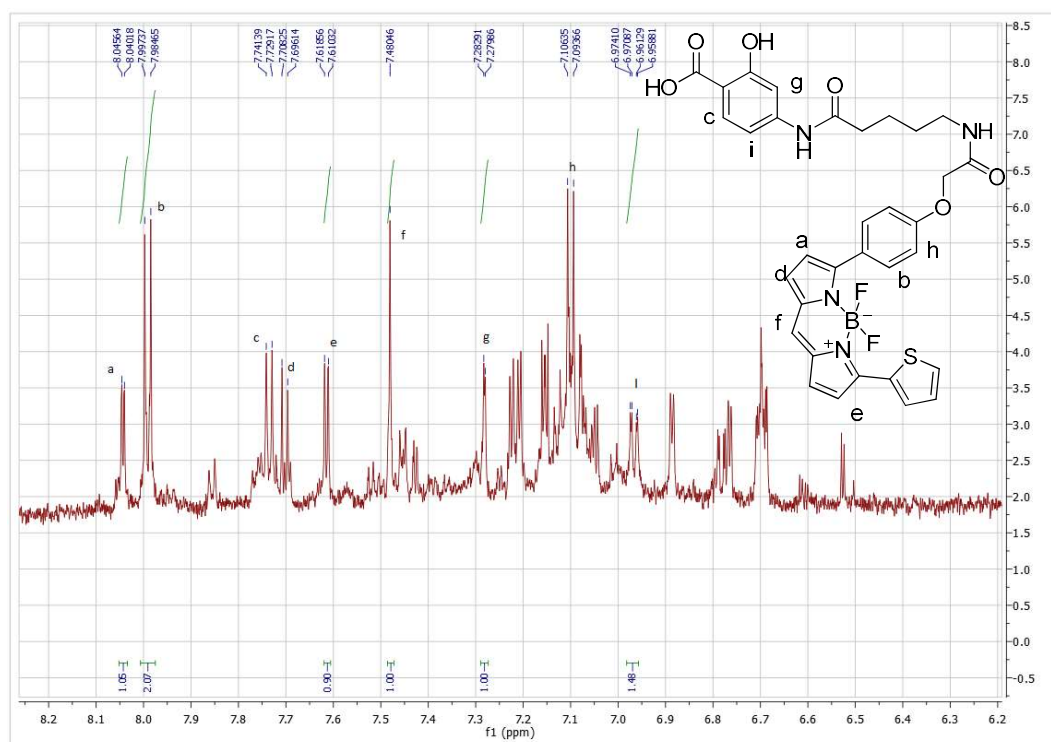


Figura 160. ^1H -RMN (700 MHz, CD_3DO) del BODIPY-AVA-ASA. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.2.

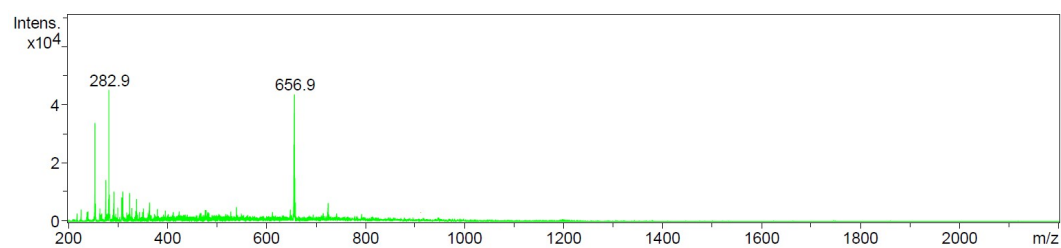


Figura 161. Espectro de masas del BODIPY-AVA-ASA realizado por electroespray en modo negativo. $[\text{M}]^-$ calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_6\text{S}^-$ 657.18 encontrado 656.9. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 2.2.

Elementos precursores de CLPs

2,5-bis(2-feniletenil)piridina (BSP)

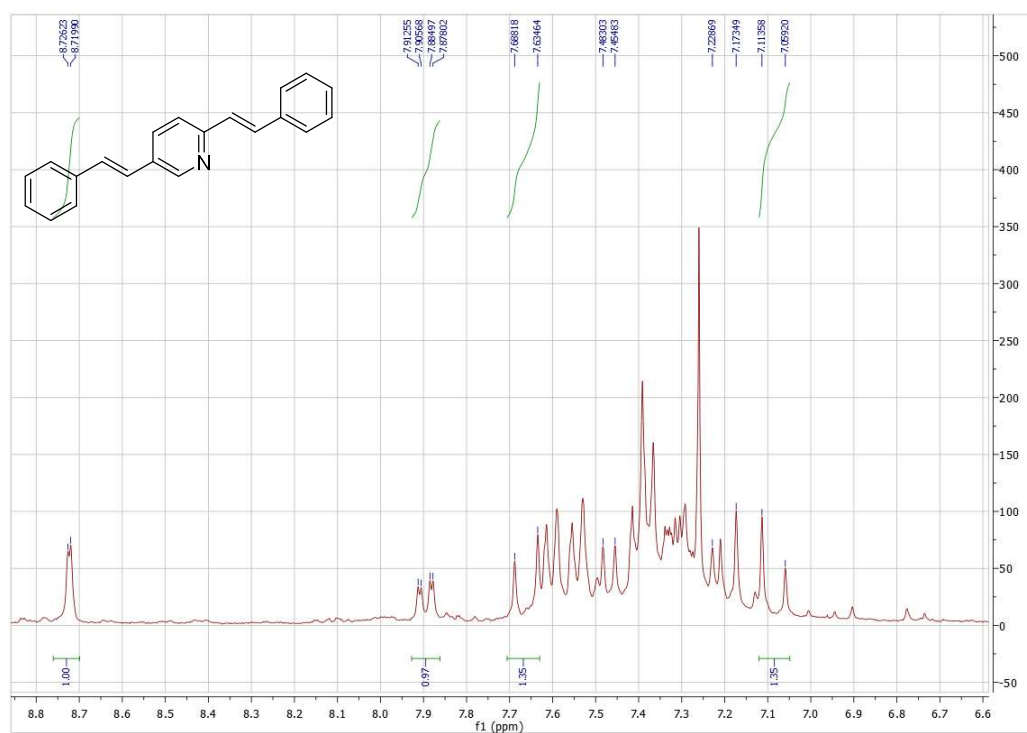


Figura 162. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de la piridina BSP. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.1.

N-N'-((2,5-dibromo-1,4-fenilen)bis(metilen))bis(N-etiletanoamina) (MNEt2)

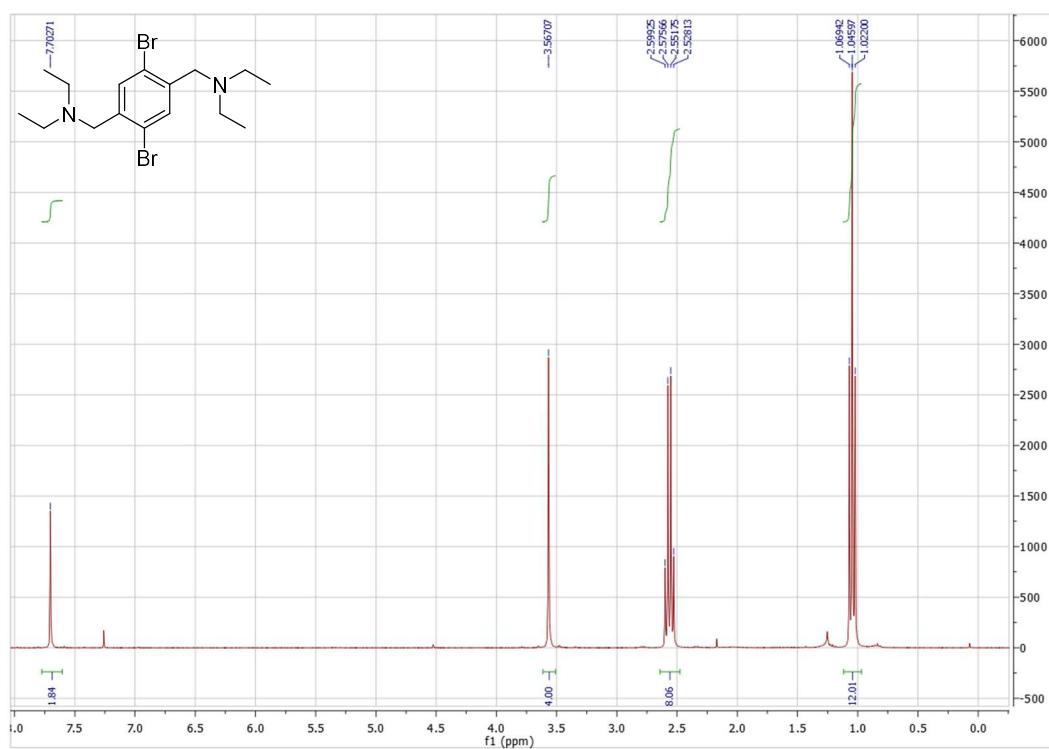


Figura 163. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de la amina MNEt₂. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.1.

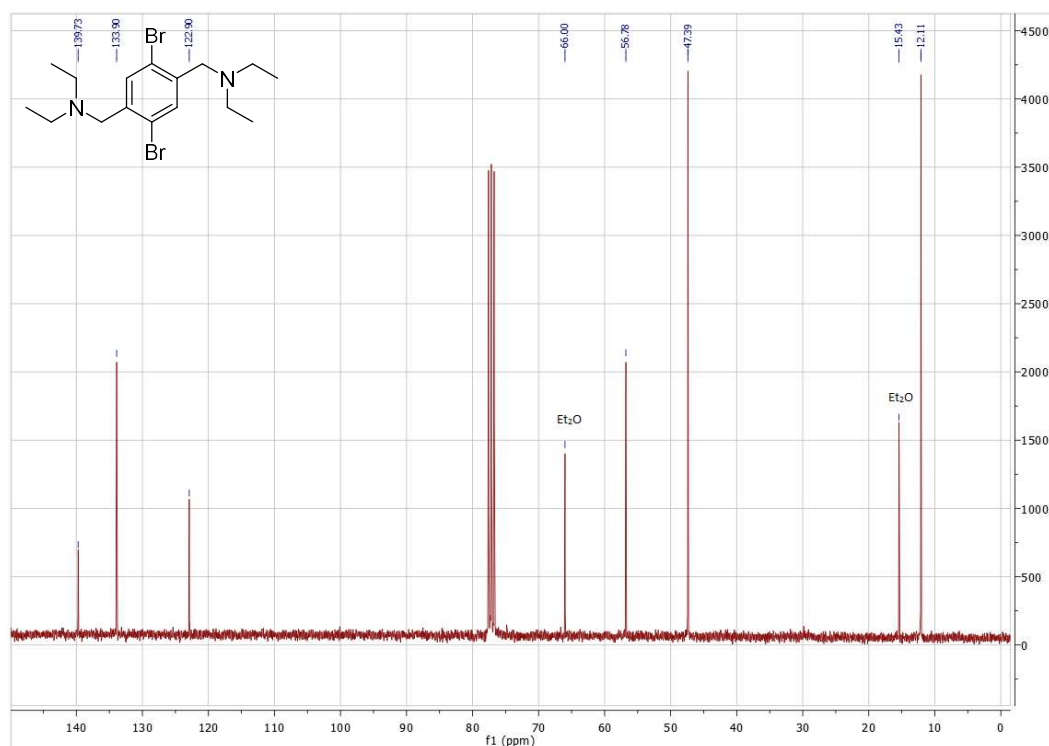


Figura 164. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) de la amina MNEt₂. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección XX.

N,N'-(2,5-di((estiril)-1,4-fenilen)bis(metilen)bis(N-etiletanamina) (BSNEt2)

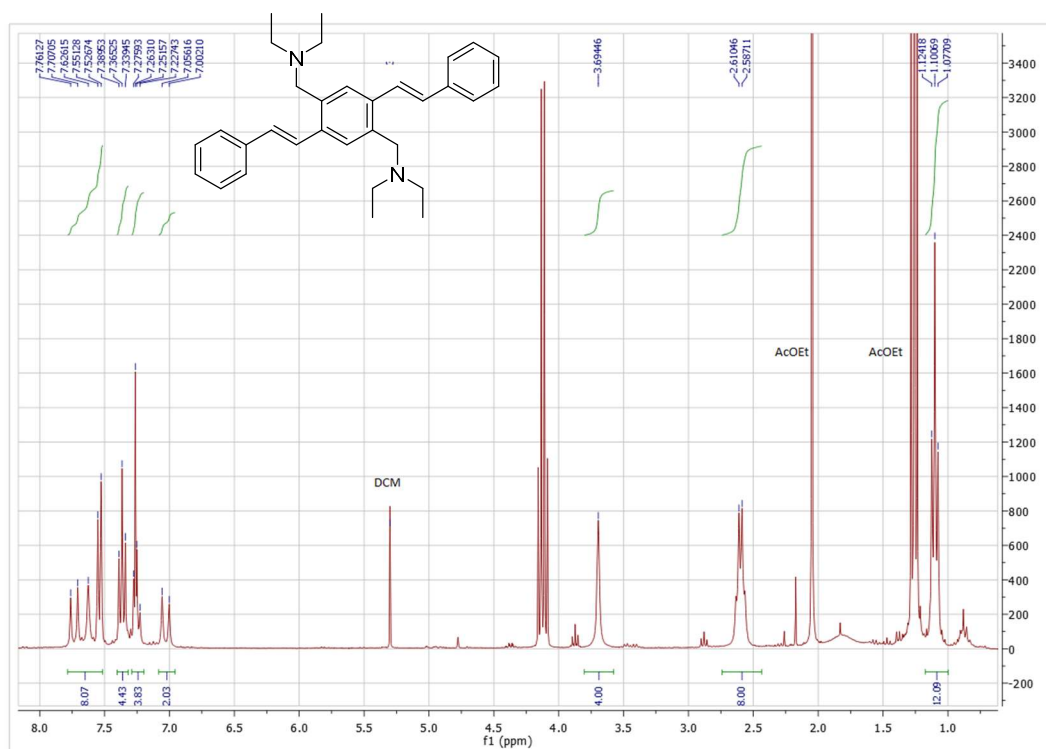


Figura 165. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) de la amina BSNEt2. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.1.

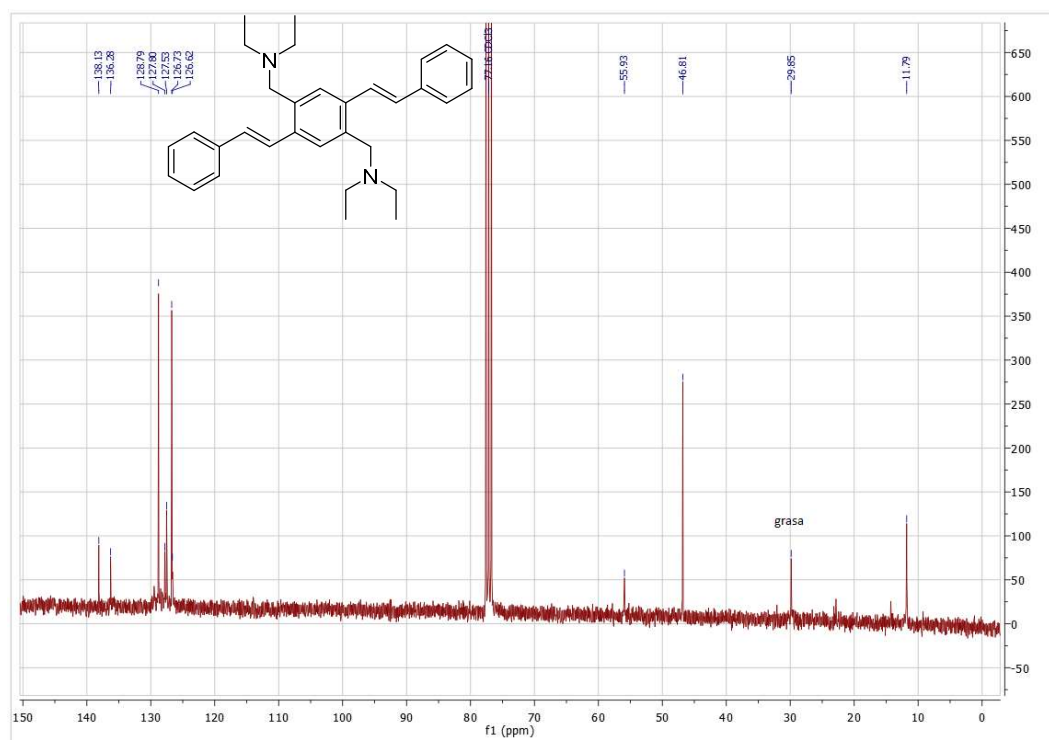


Figura 166. ¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃) de la amina BSNEt2. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.1.

1-(2,5-dibromofenil)-3-feniltiourea (3.7)

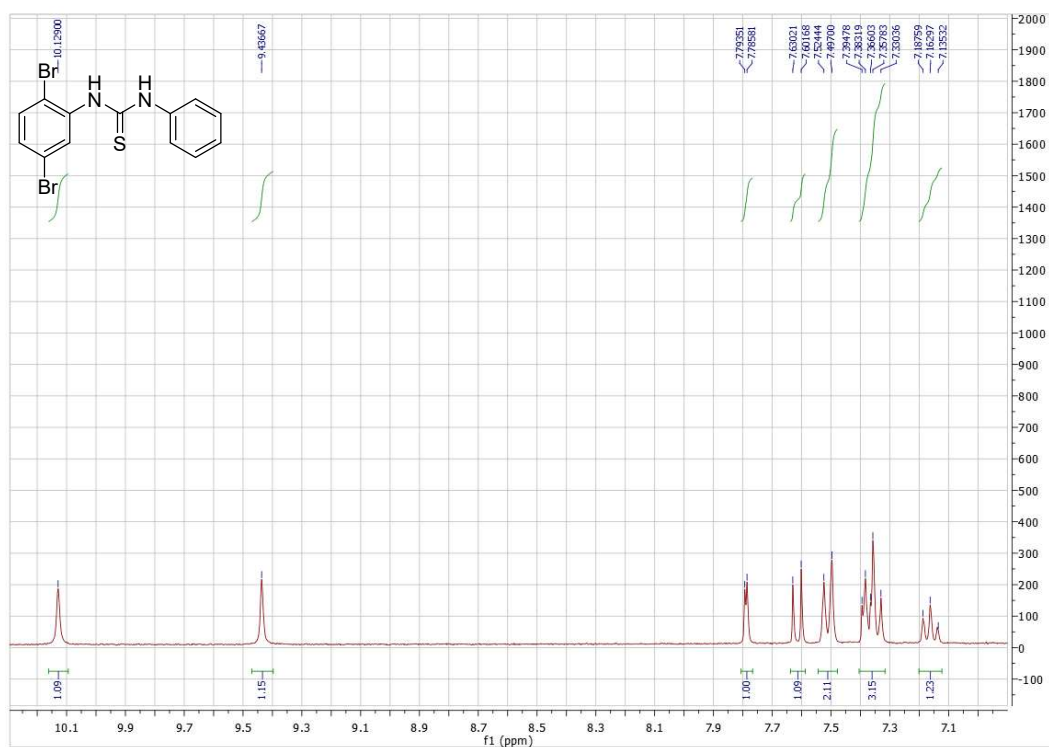


Figura 167. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) de la 1-(2,5-dibromofenil)-3-feniltiourea. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

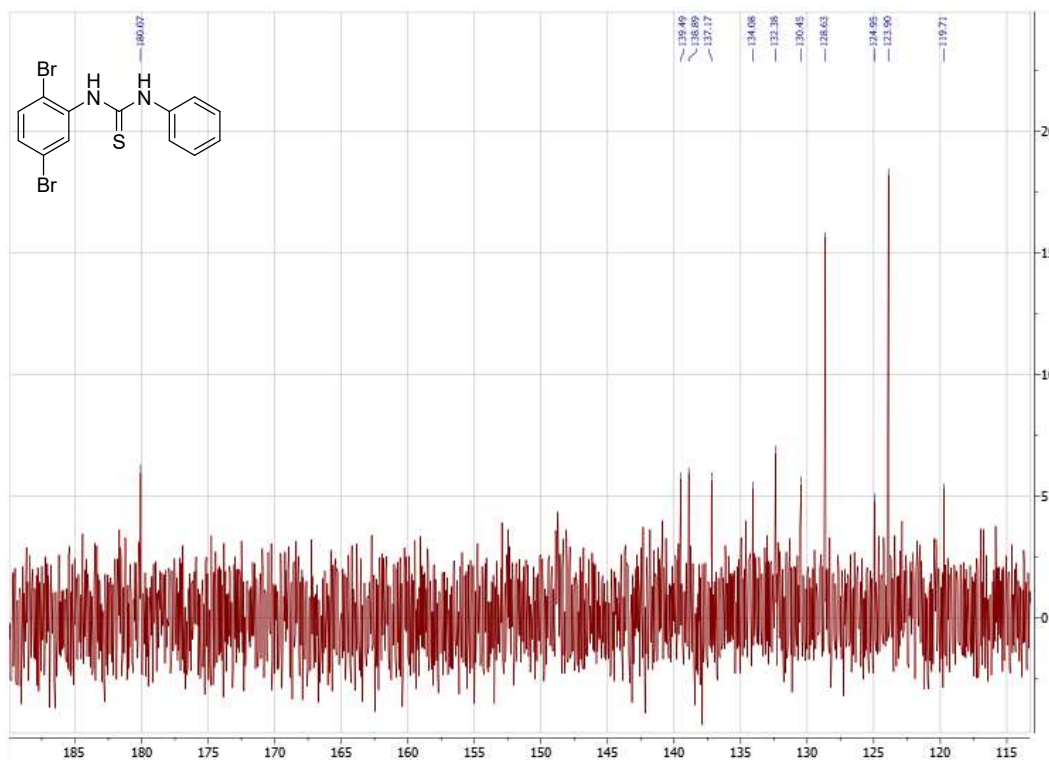


Figura 168. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆) de la 1-(2,5-dibromofenil)-3-feniltiourea. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

2,5-di((E)-estiril)anilina (DSA)

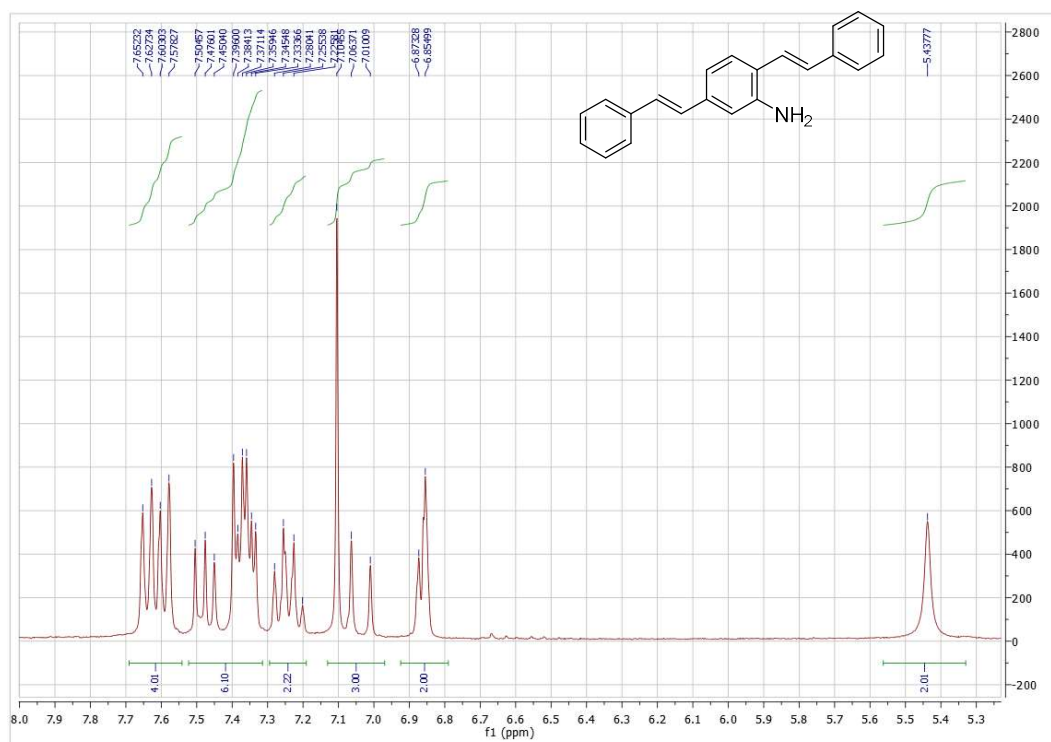


Figura 169. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) de la amina DSA. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

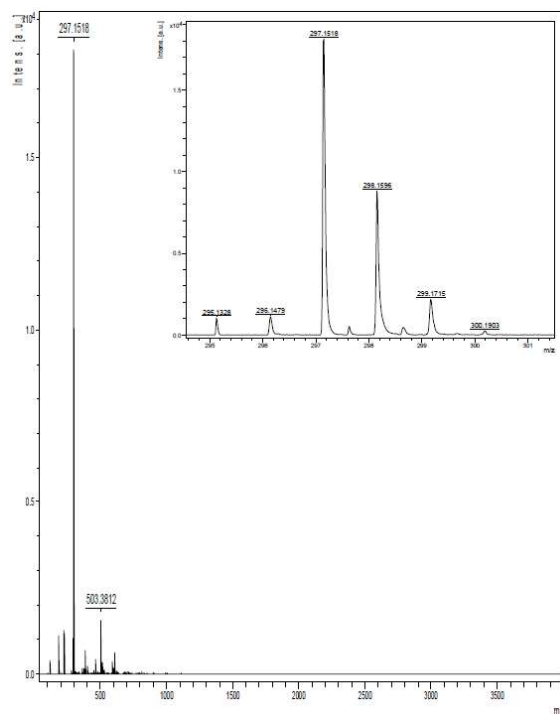


Figura 170. Espectro de masas de alta resolución de la amina DSA, realizado por ionización láser asistida por matriz (MALDI) midiendo el tiempo de vuelo. [M]⁺ calculado para C₂₂H₁₉N⁺ 297.1517 encontrado 297.1518. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

1-(2,5-dibromofenil)-3-(4-nitrofenil)urea (3.9)

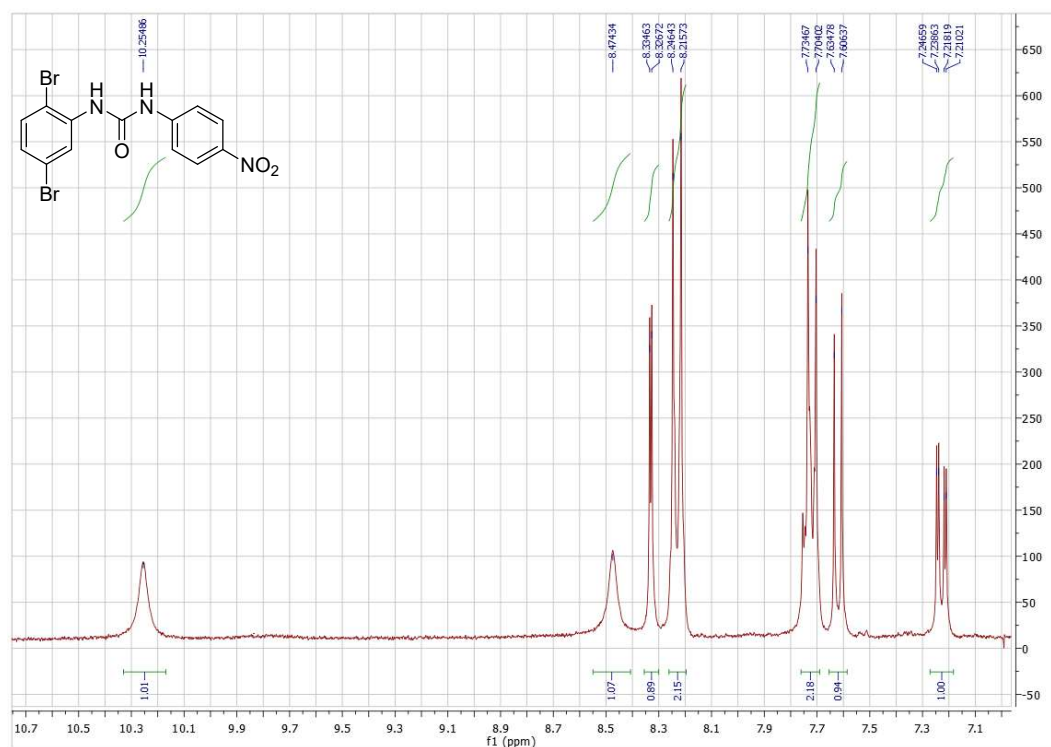


Figura 171. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) de la 1-(2,5-dibromofenil)-3-(4-nitrofenil)urea. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

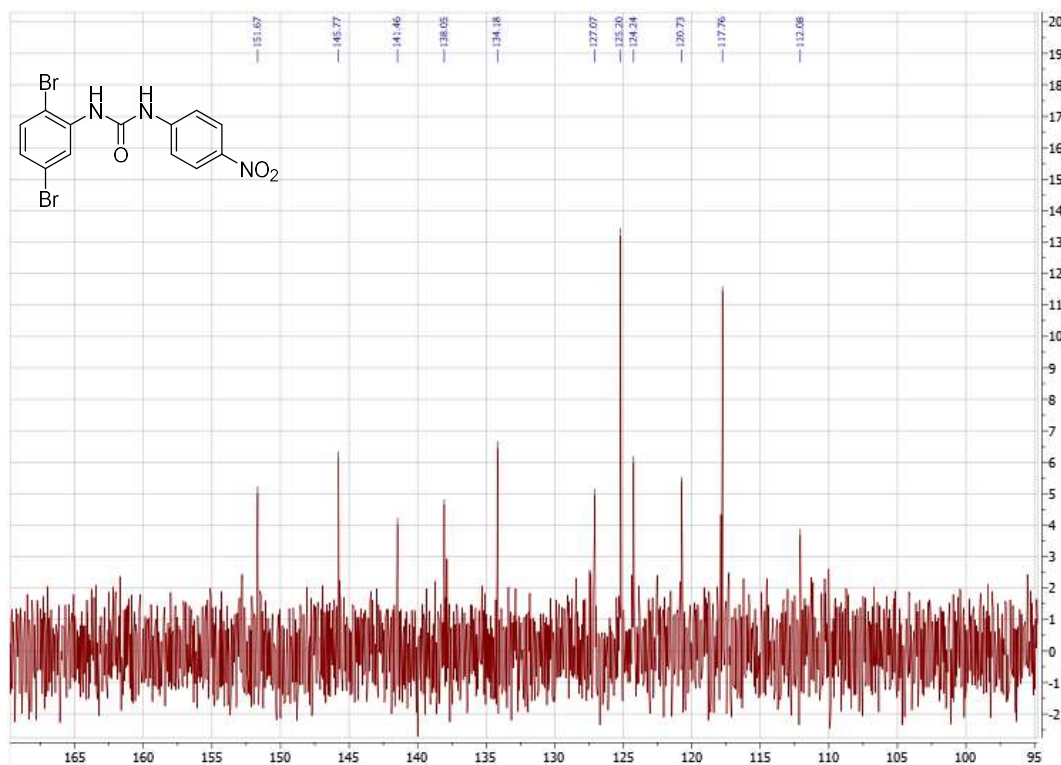


Figura 172. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆) de la 1-(2,5-dibromofenil)-3-(4-nitrofenil)urea. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

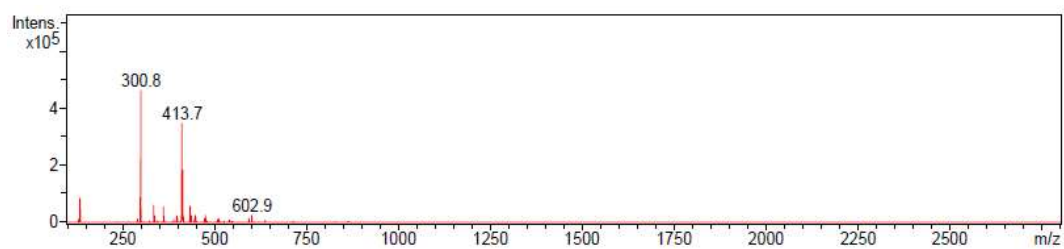


Figura 173. Espectro de masas de la 1-(2,5-dibromofenil)-3-(4-nitrofenil)urea, realizado por electrospray en modo positivo. $[M+H]^+$ calculado para $C_{13}H_{10}Br_2N_3O_3^+$ 413.9 encontrado 413.7. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

1-(2,5-di((E)-estiril)fenil)-3-(4-nitrofenil)urea (BDSNU)

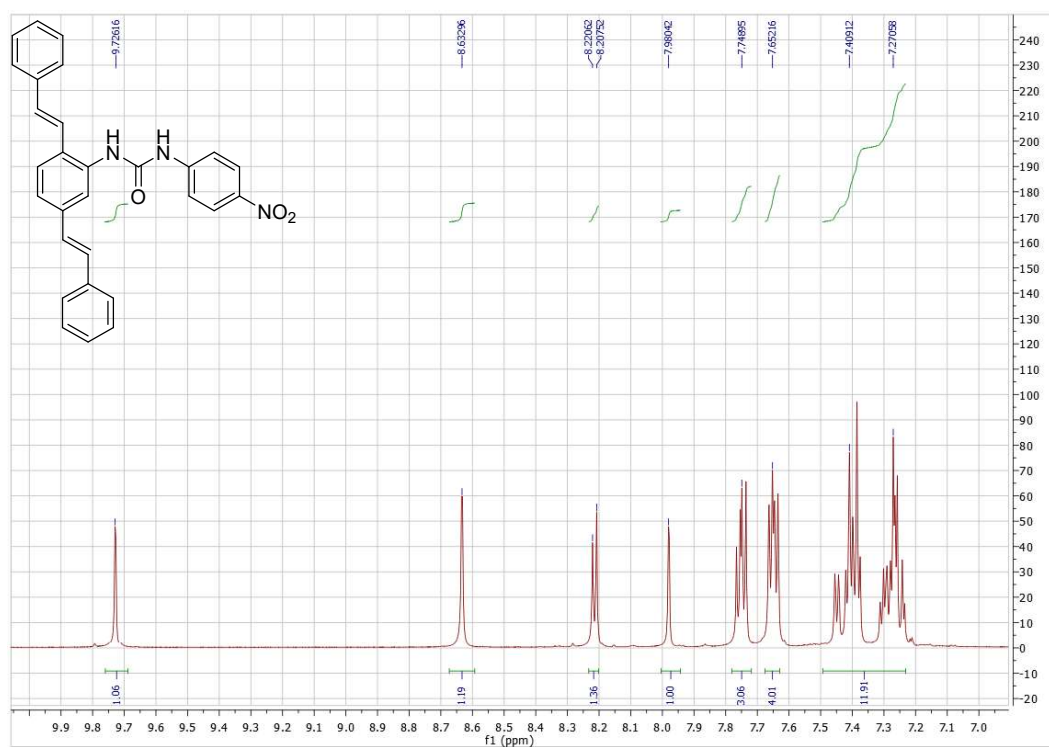


Figura 174. ^1H -RMN (700 MHz, DMSO-d_6) de la urea BDSNU. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

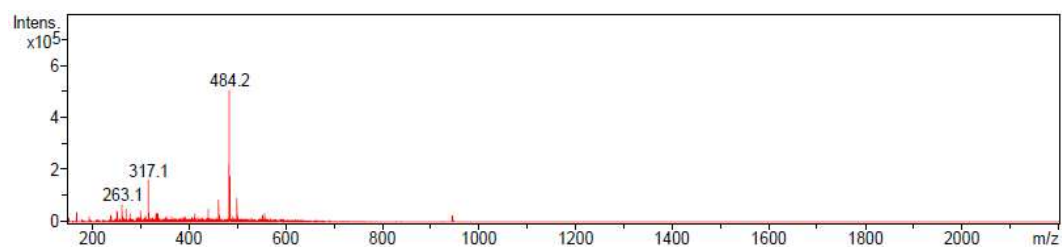


Figura 175. Espectro de masas de la urea BDSNU, realizado por electroespray en modo positivo. $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}^+$ 484.2 encontrado 484.2. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección XX.

1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-3-(2,5-di((E)-estiril)fenil)urea (BDSU)

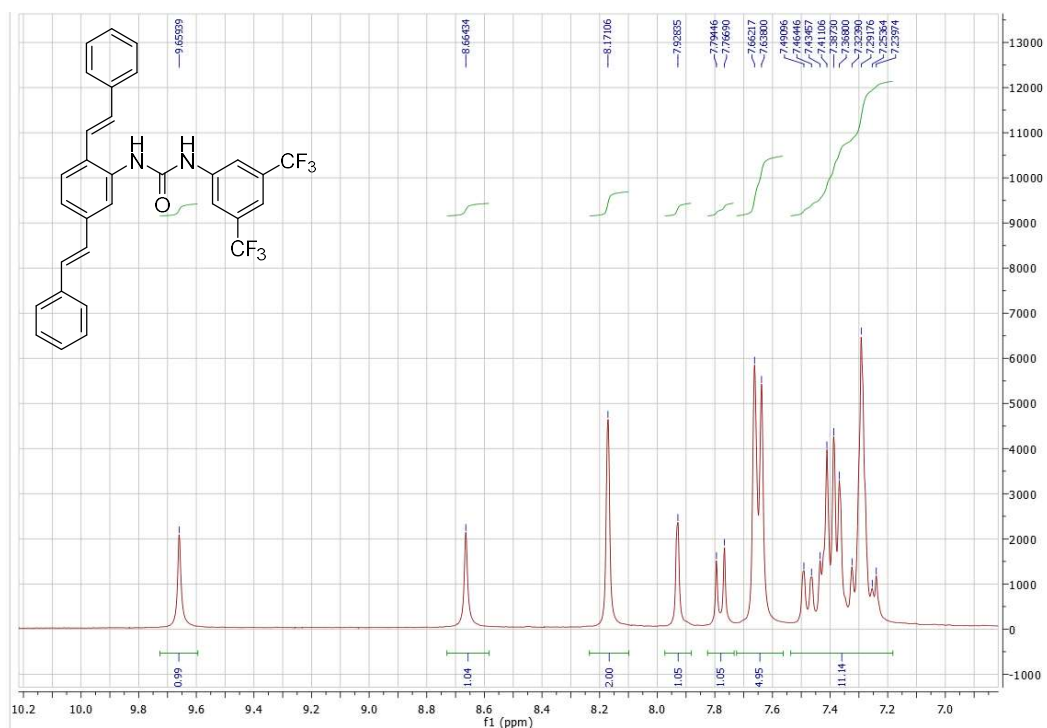


Figura 176. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6) de la urea BDSU. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

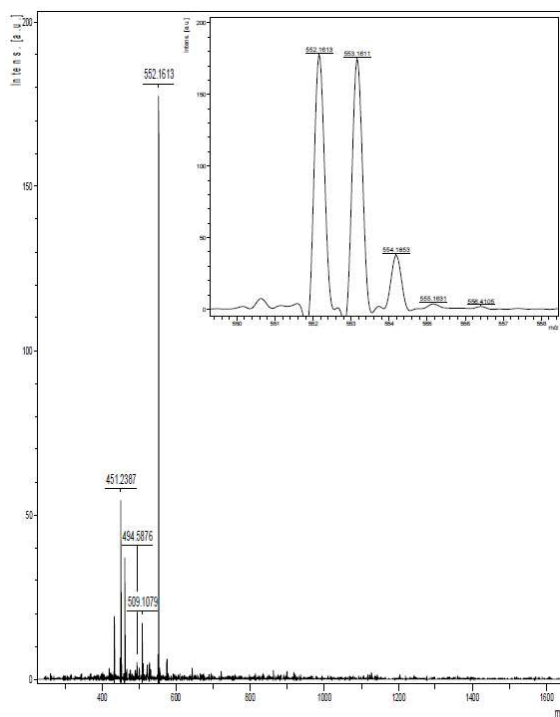


Figura 177. Espectro de masas de alta resolución de la urea BDSU, realizado por ionización láser asistida por matriz (MALDI) midiendo el tiempo de vuelo. $[\text{M}]^+$ calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}^+$ 552.1636 encontrado 552.1613. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

(E)-2-(2,5-dimetoxiestiril)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (3.13)

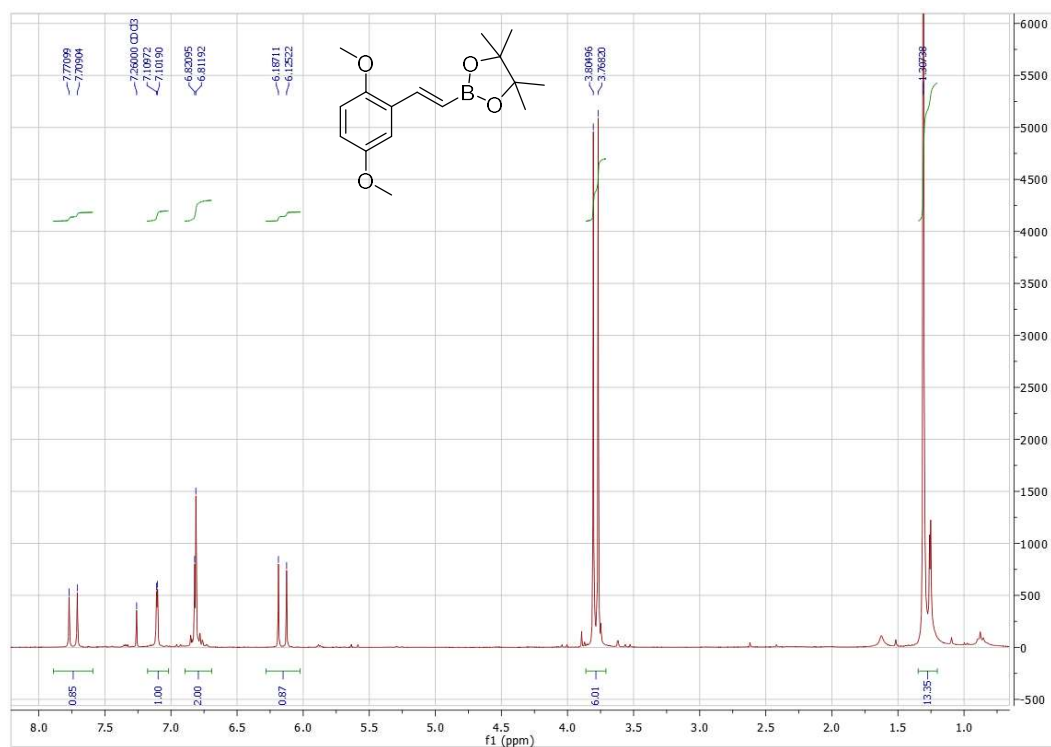


Figura 178. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del (E)-2-(2,5-dimetoxiestiril)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

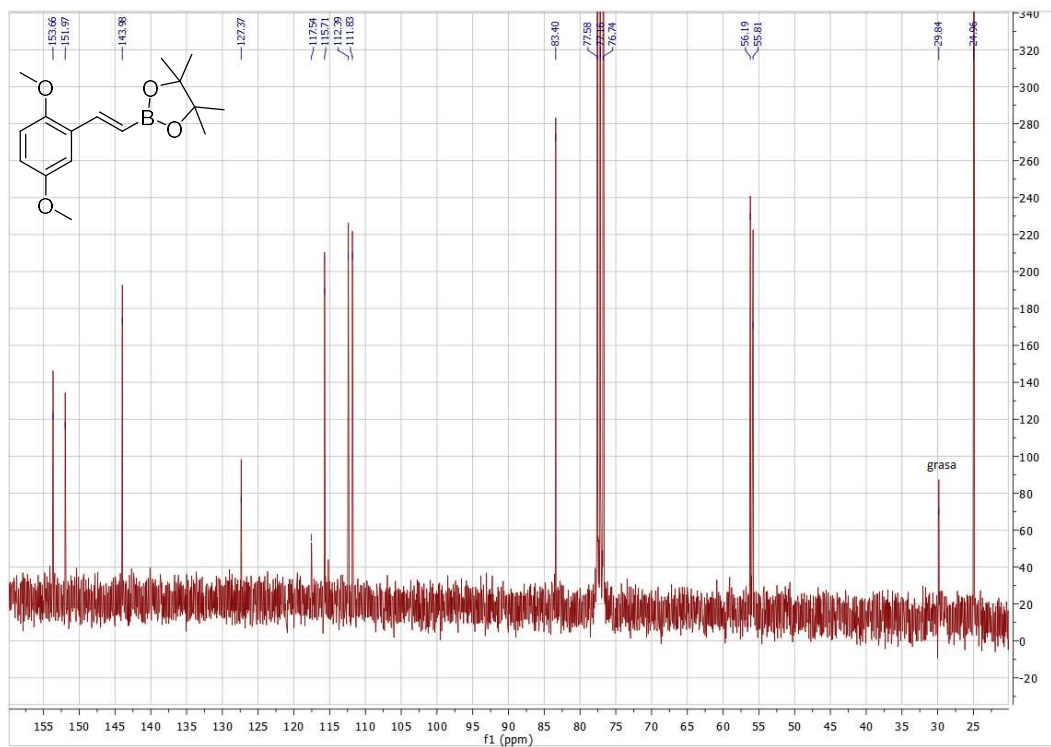


Figura 179. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) del (E)-2-(2,5-dimetoxiestiril)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

((2,5-dimetoxifenil)etnil)trimetilsilano (3.14)

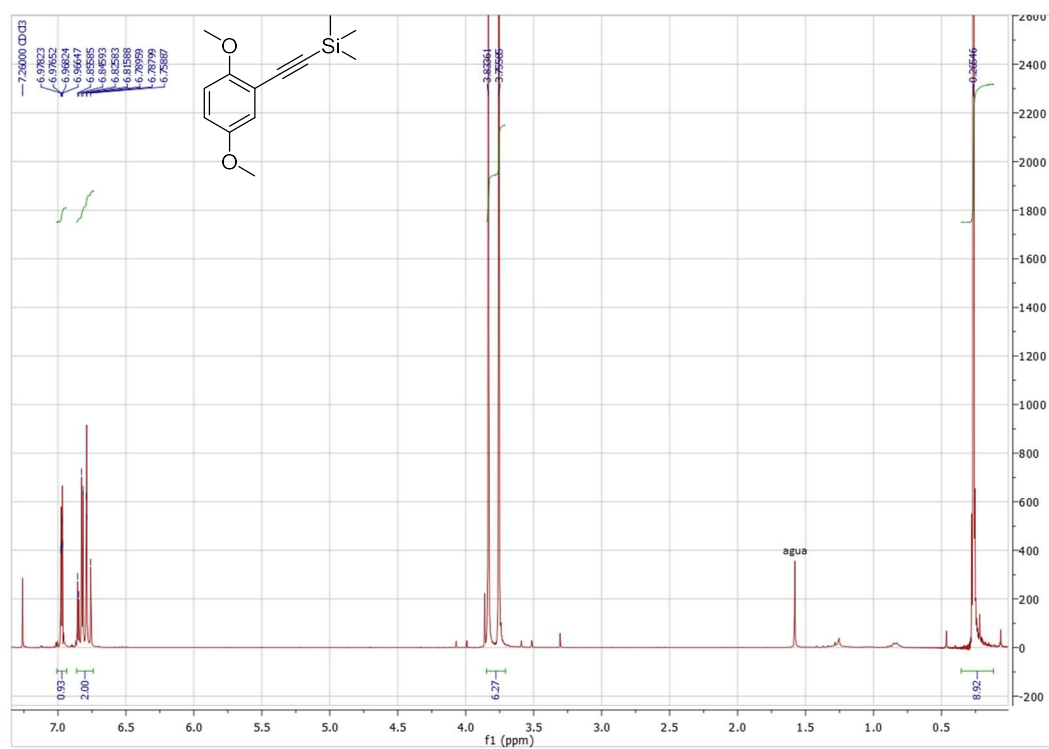


Figura 180. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del ((2,5-dimetoxifenil)etnil)trimetilsilano. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

2-etinil-1,4-dimetoxibenceno (3.15)

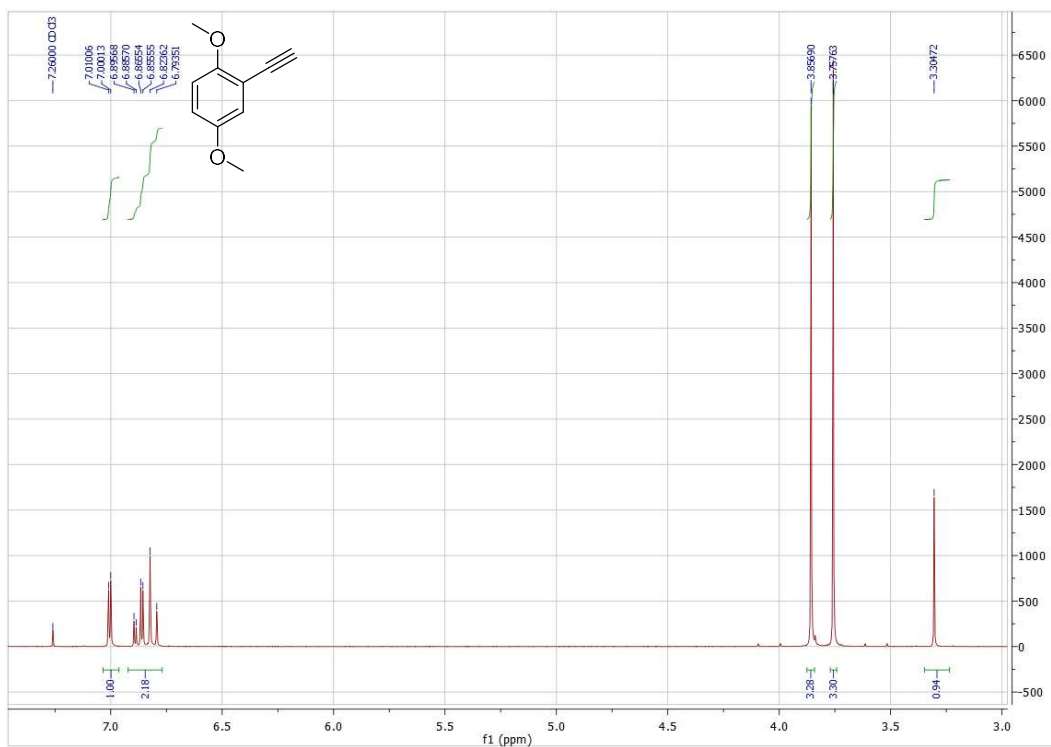


Figura 181. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del 2-etinil-1,4-dimetoxibenceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

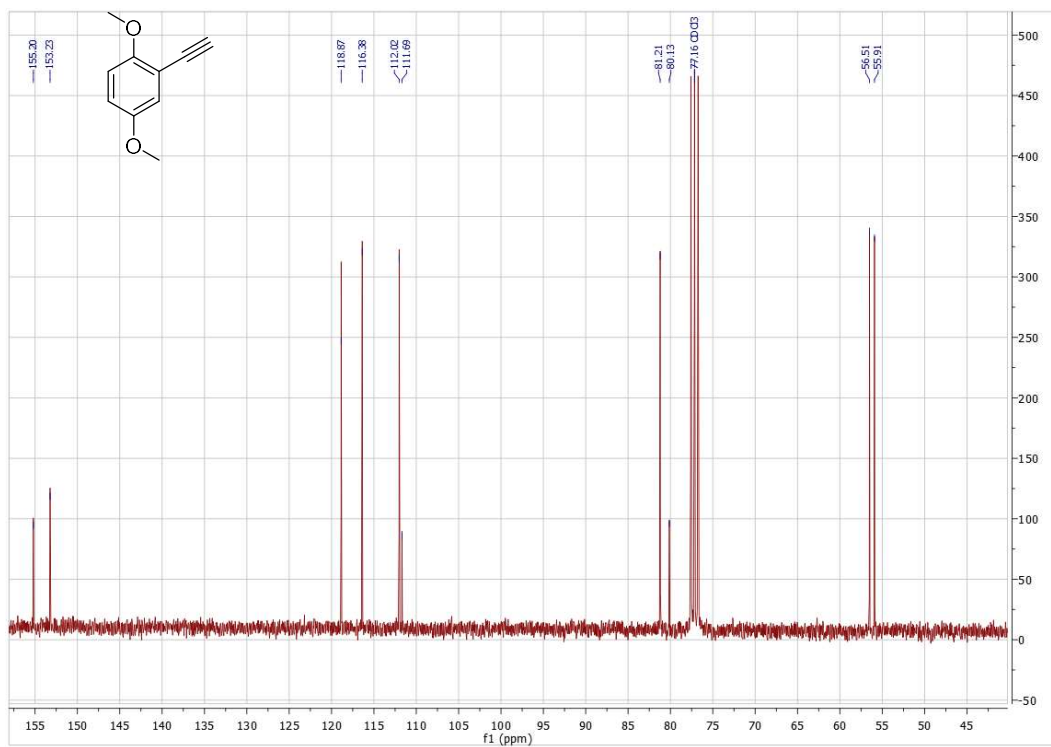


Figura 182. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) del 2-etinil-1,4-dimetoxibenceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

2,5-Divinililina (DVA)

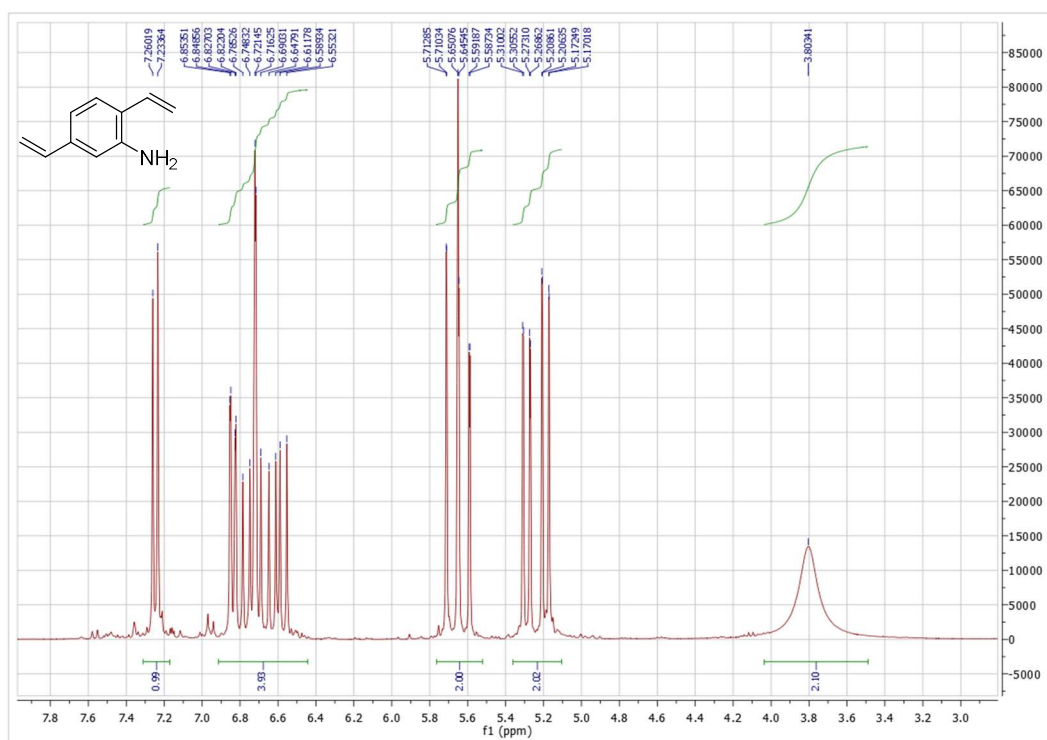


Figura 183. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) de la 2,5-Divinililina (DVA). Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

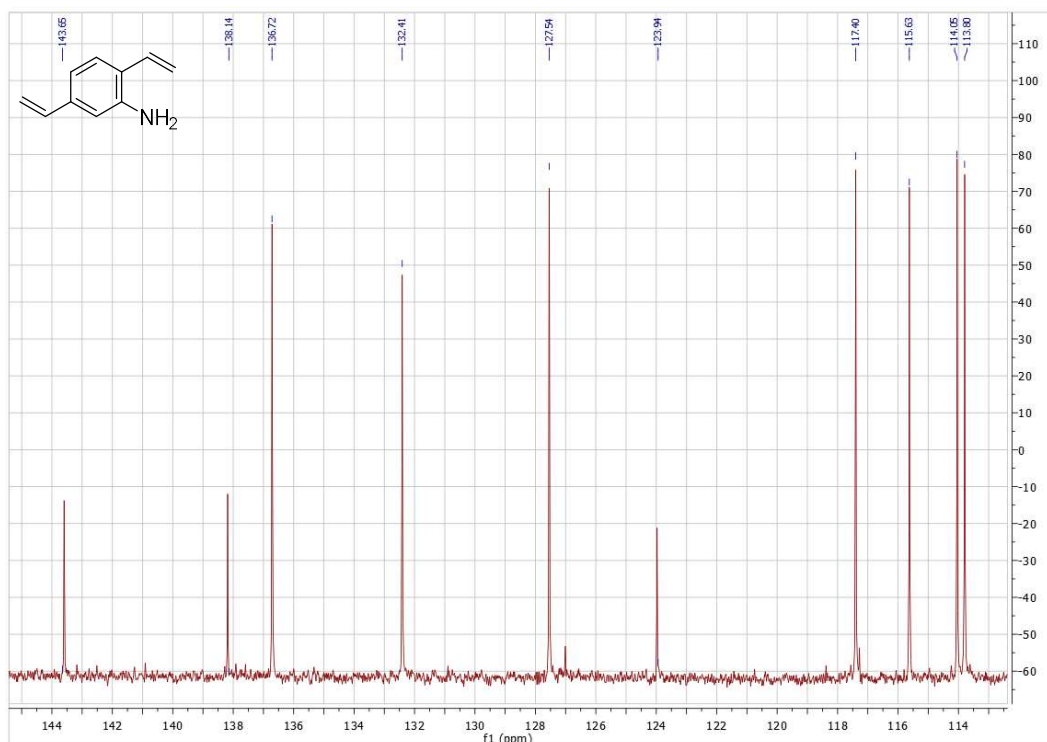


Figura 184. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆) de la 2,5-divinililina (DVA). Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

2,5-Bis((E)-2,5-dimetoxiestiril)anilina (DMA)

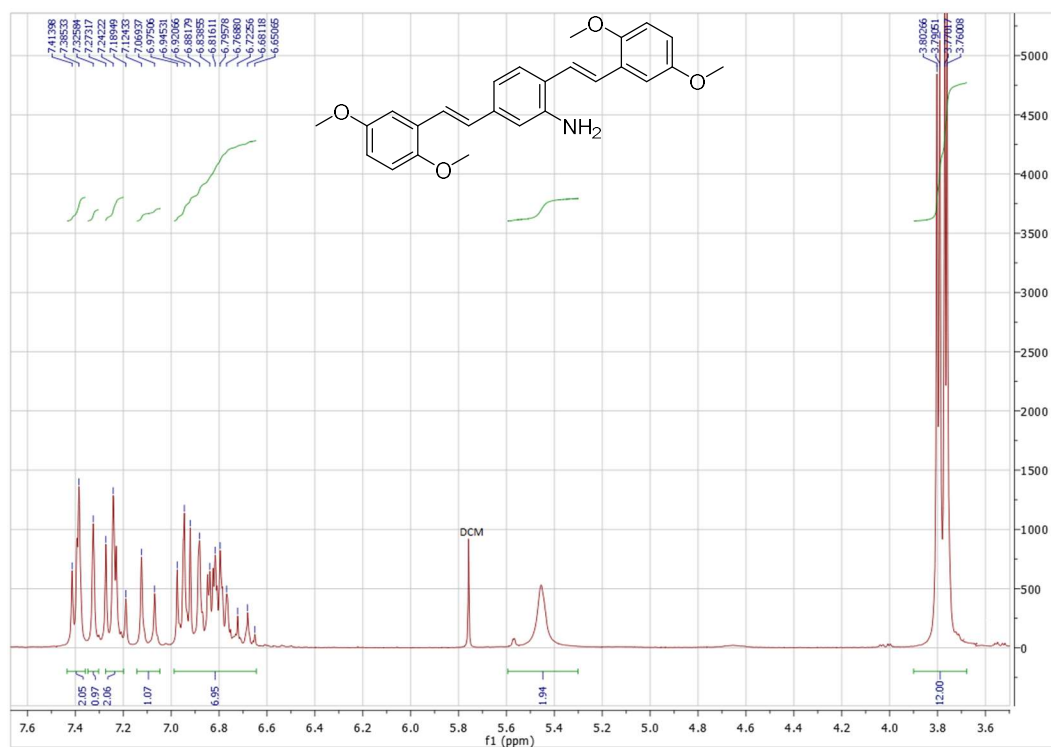


Figura 185. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) de la amina DMA. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

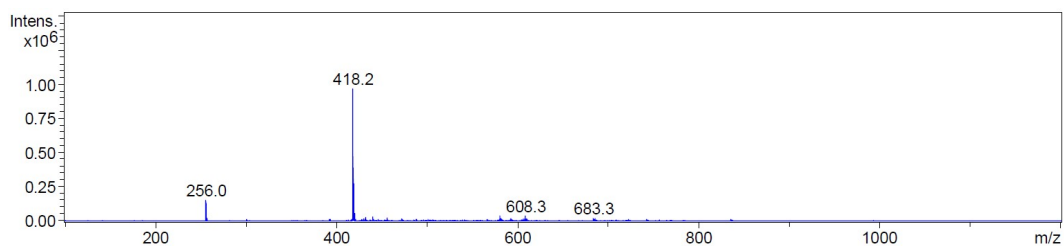


Figura 186. Espectro de masas de la amina DMA, realizado por electrospray en modo positivo. [M+H]⁺ calculado para C₂₆H₂₈N₂O₄⁺ 418.2 encontrado 418.2. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, procedimiento 1, Sección 3.2.

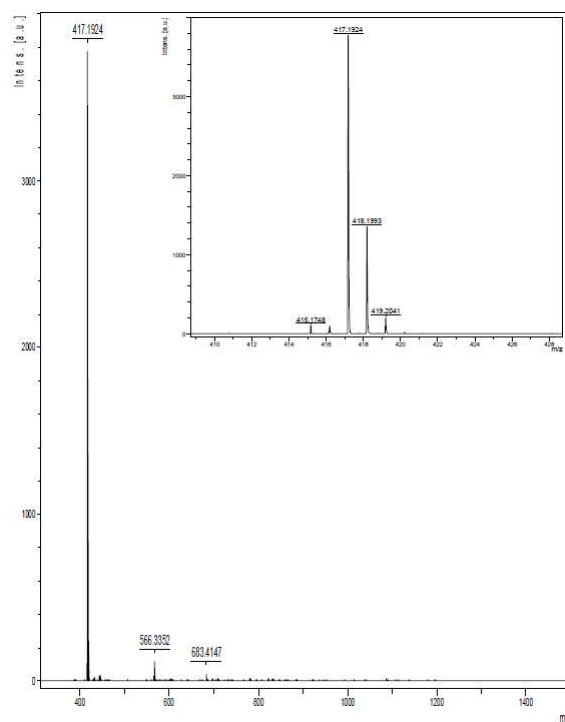


Figura 187. Espectro de masas de alta resolución de la amina DMA, realizado por ionización láser asistida por matriz (MALDI) midiendo el tiempo de vuelo. $[M]^+$ calculado para $C_{26}H_{27}NO_4^+$ 417.1940 encontrado 417.1924. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, procedimiento 2, Sección 3.2.

1-(2,5-bis((*E*)-2,5-dimetoxiestiril)fenil)-3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)urea (BMSU)

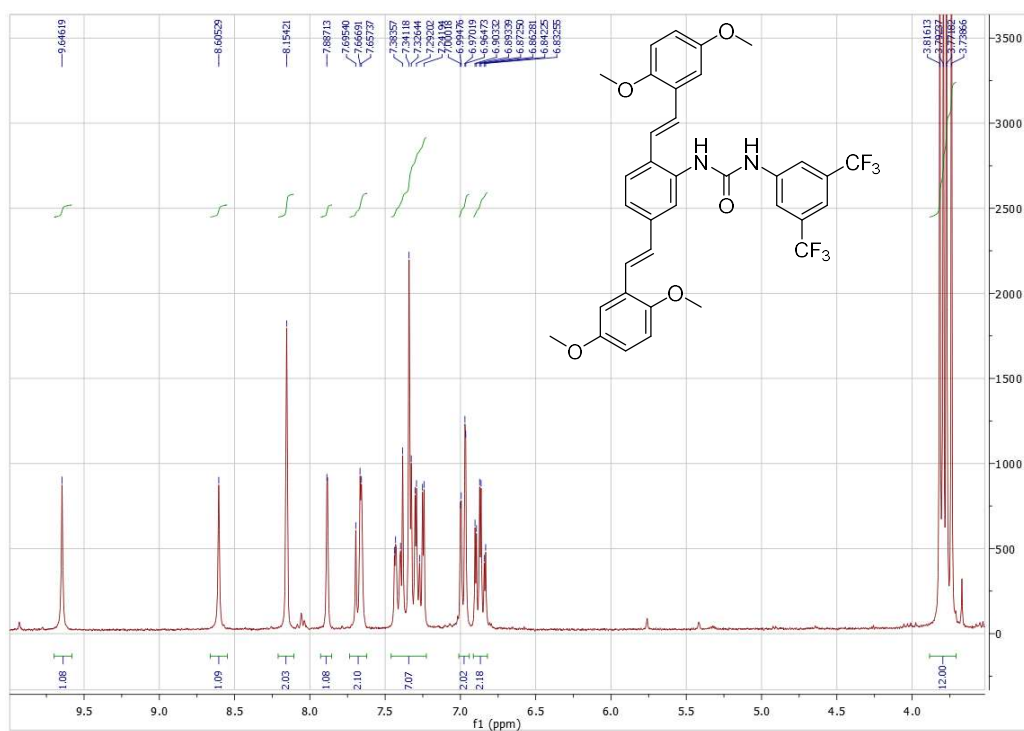


Figura 188. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) de la urea BMSU. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

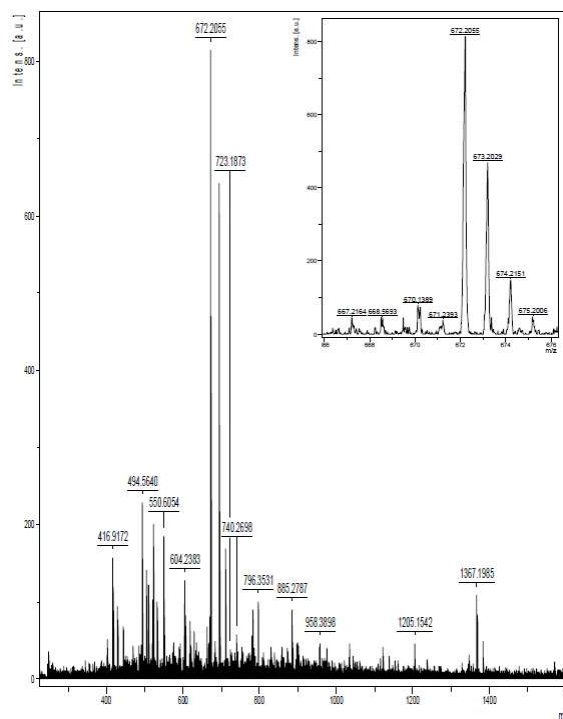


Figura 189. Espectro de masas de alta resolución de la urea BMSU, realizado por ionización láser asistida por matriz (MALDI) midiendo el tiempo de vuelo. [M]⁺ calculado para C₃₅H₃₀F₆N₂O₅⁺ 672.2059 encontrado 672.2055. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

Dimetil-2-viniltireftalato (3.19)

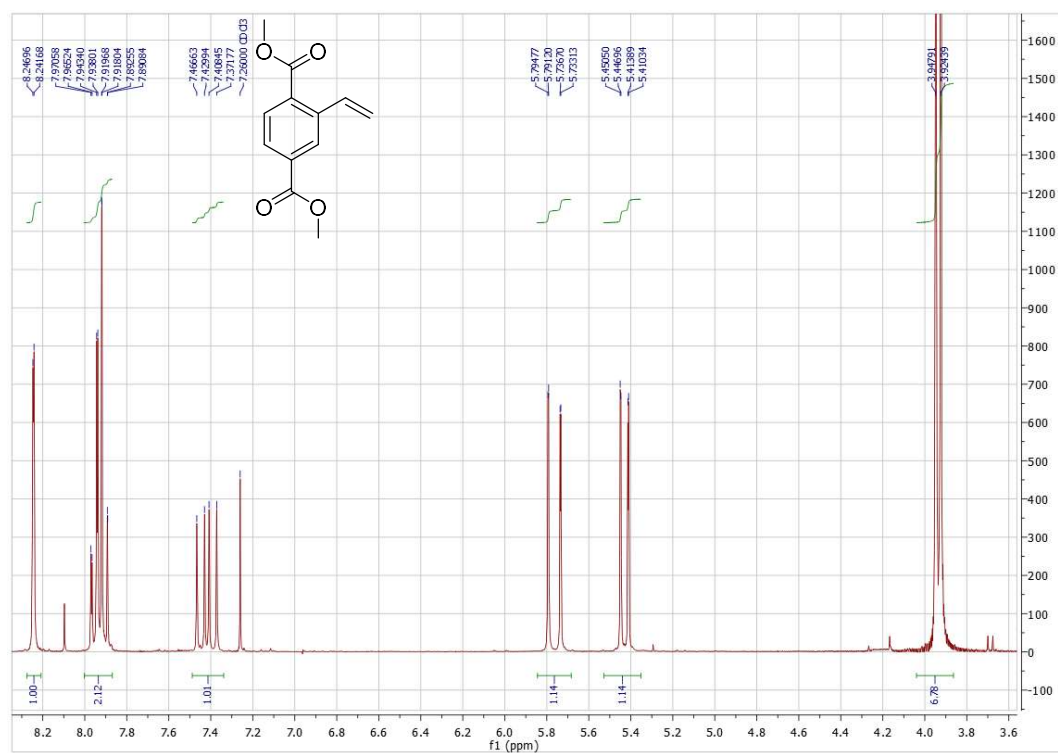


Figura 190. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del dimetil-2-viniltireftalato. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

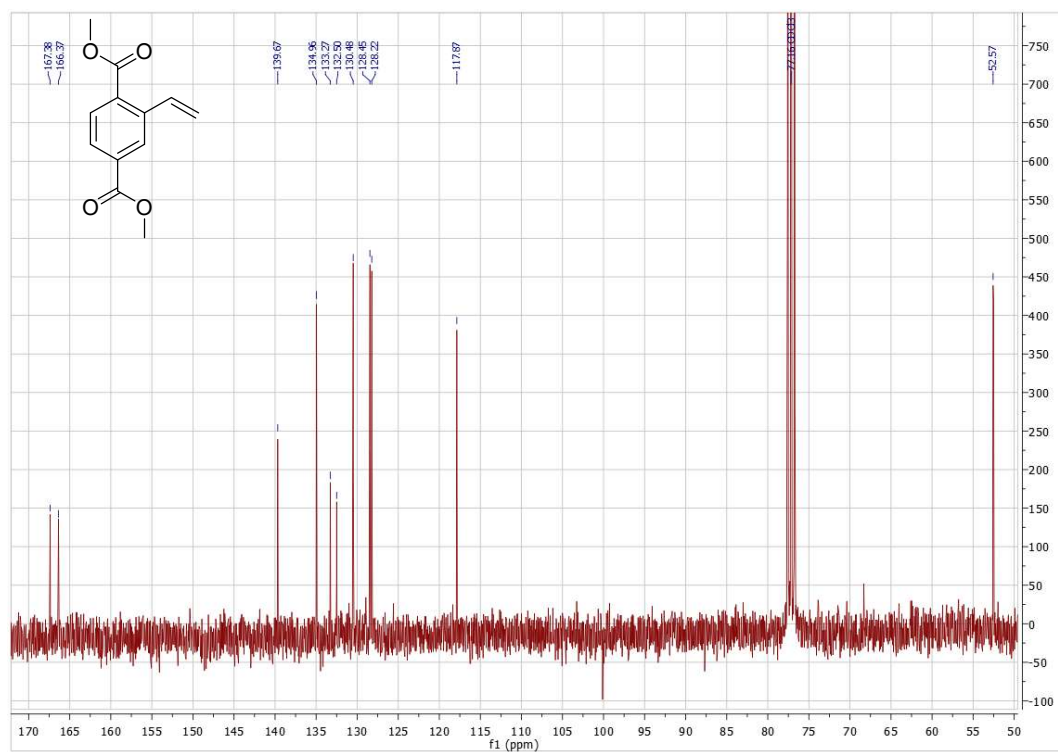


Figura 191. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) del dimetil-2-viniltireftalato. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

Dimetil-2-((trimetilsilil)etnil)tereftalato (3.20)

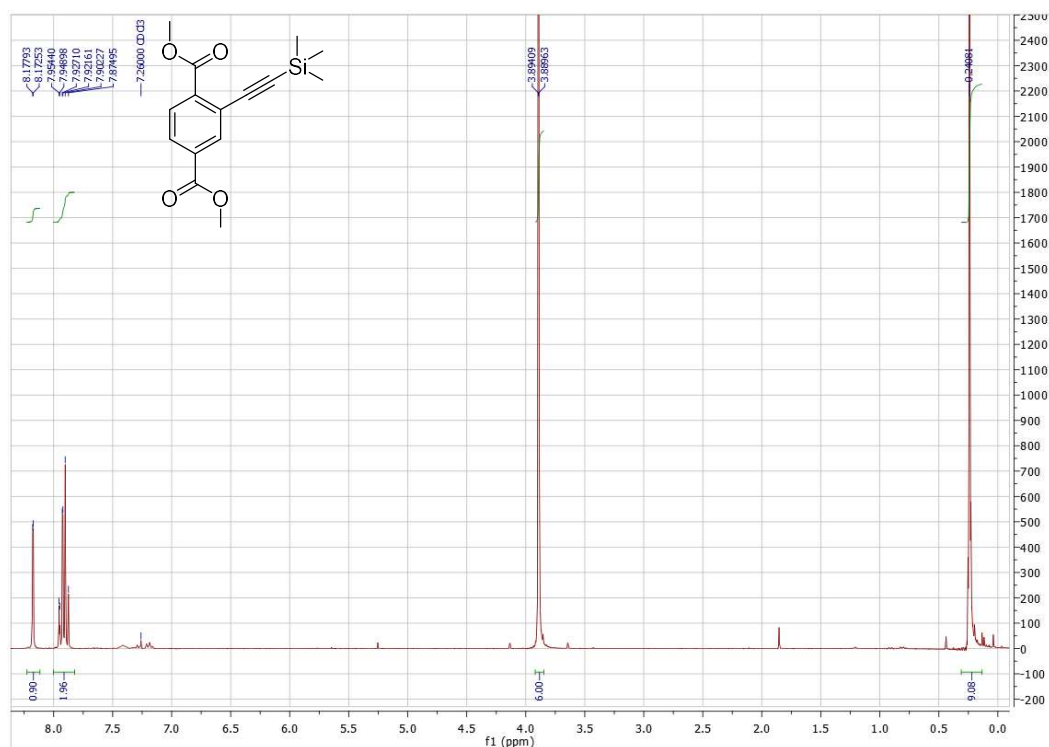


Figura 192. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del dimetil 2-((trimetilsilil)etnil)tereftalato. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

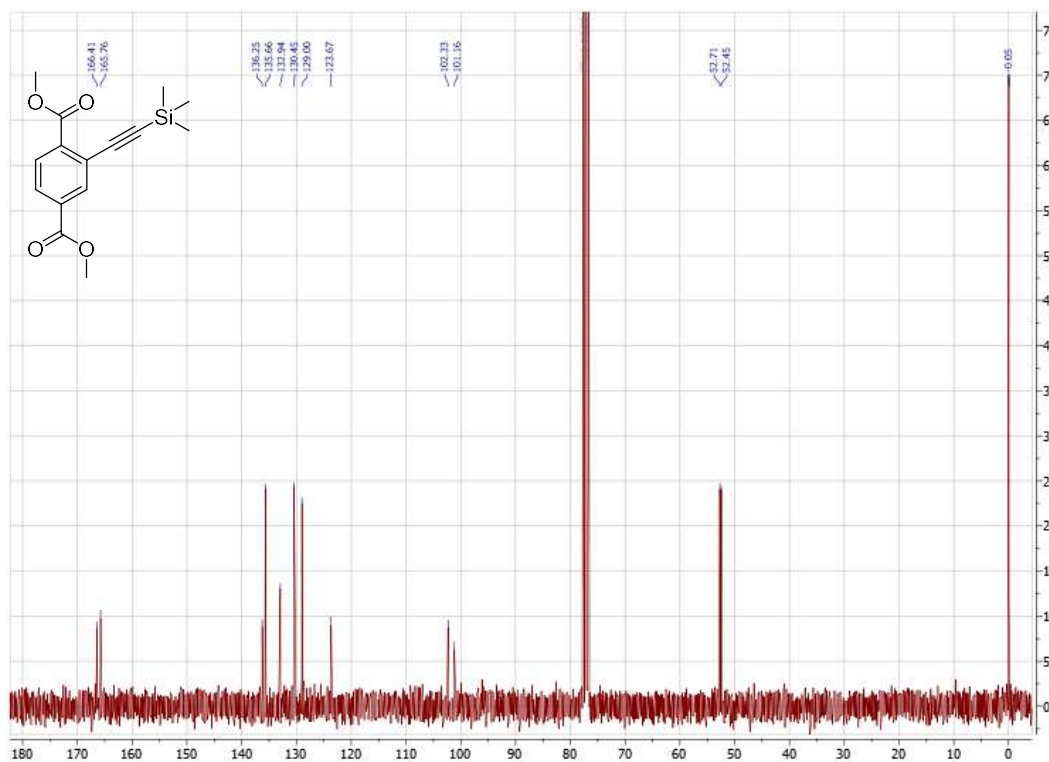


Figura 193. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) del dimetil 2-((trimetilsilil)etnil)tereftalato. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

Dimetil 2-etiniltereftalato (3.21)

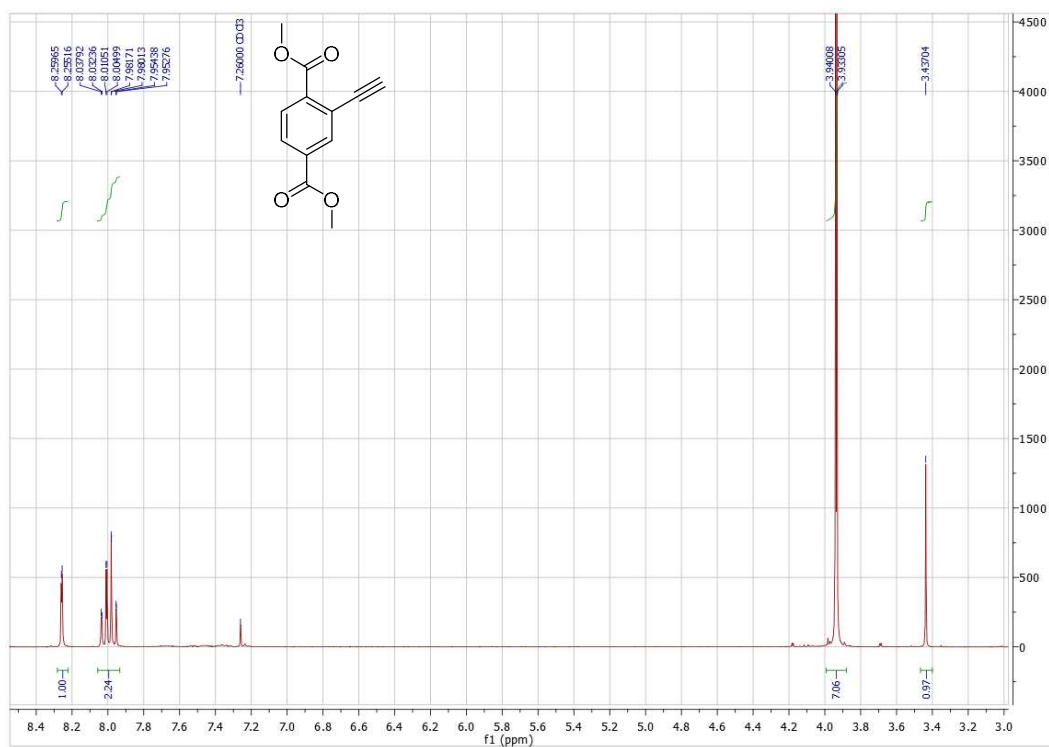


Figura 194. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del dimetil-2-etiniltereftalato. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

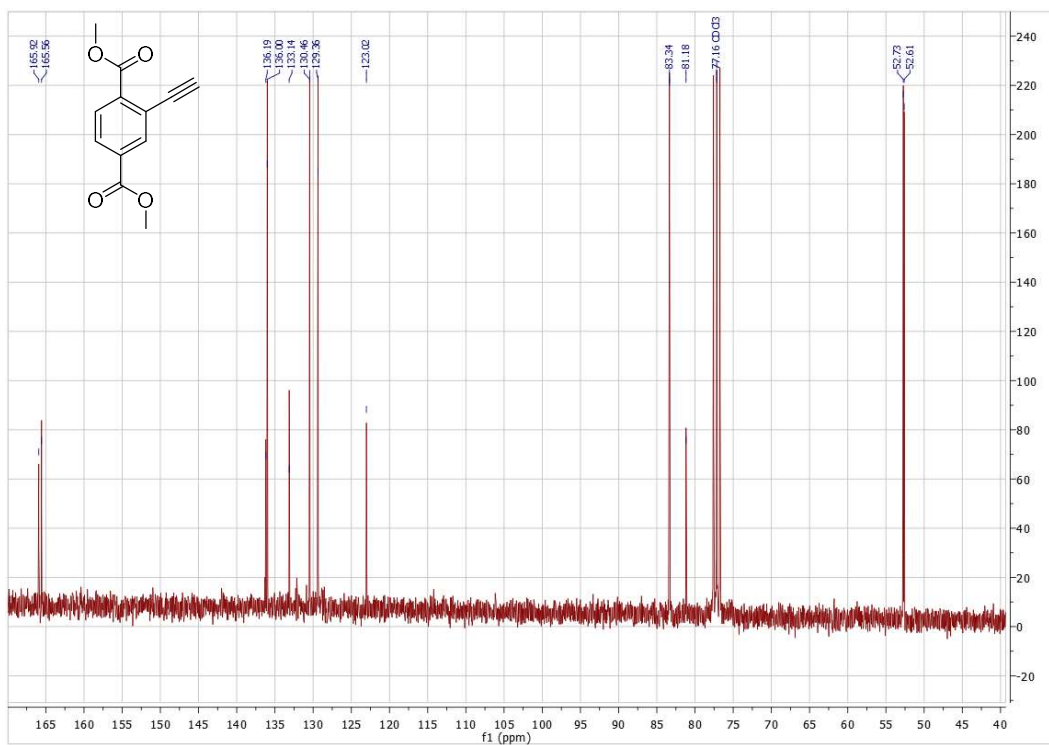


Figura 195. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) del dimetil 2-etiniltereftalato. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

Tetrametil 2,2'-((1*E*,1'*E*)-(2-amino-1,4-fenilen) bis(eteno-2,1-diil)) ditereftalato (DPA)

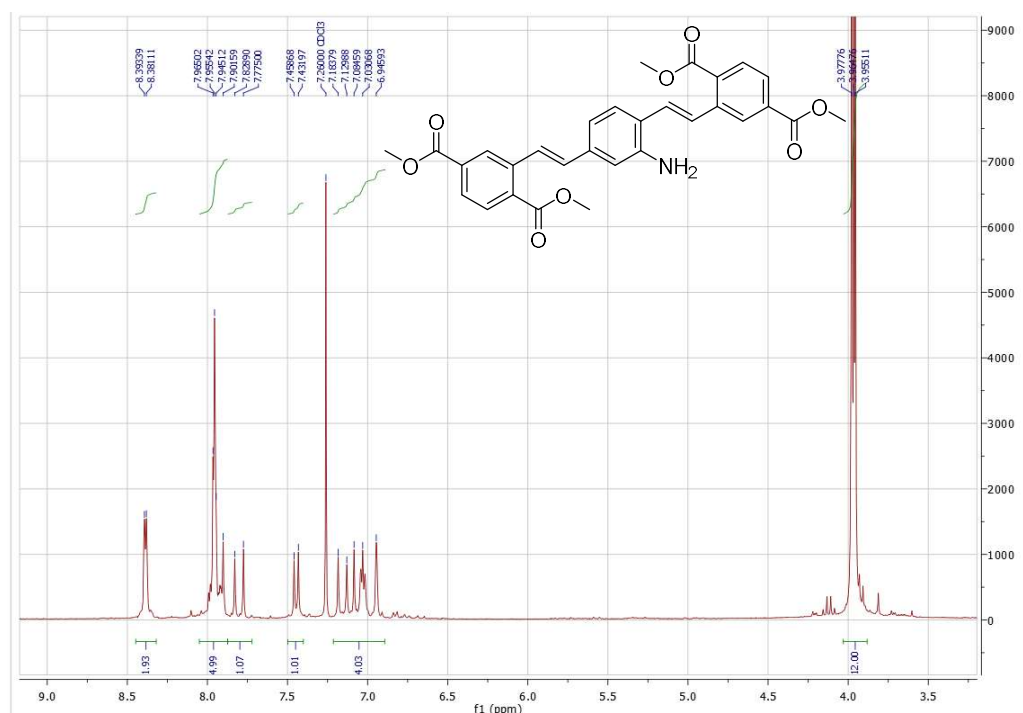


Figura 196. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de la amina DPA. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

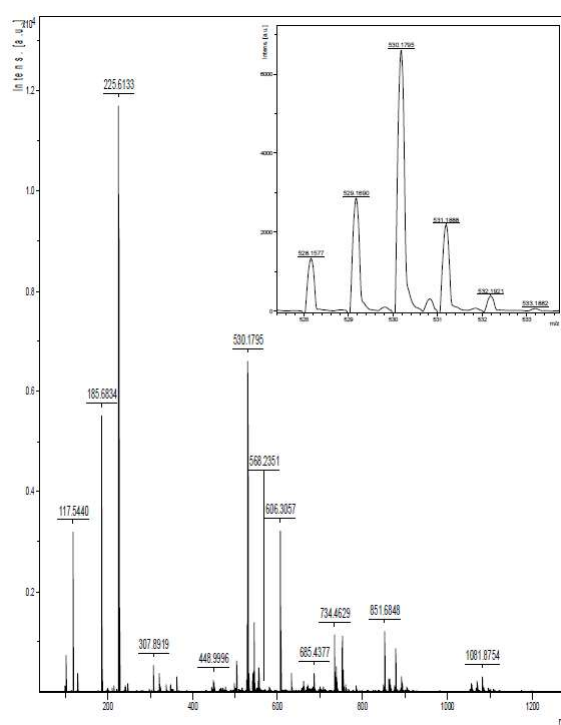


Figura 197. Espectro de masas de alta resolución de la amina DPA, realizado por ionización láser asistida por matriz (MALDI) midiendo el tiempo de vuelo. $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{NO}_4^+$ 530.1809 encontrado 530.1795. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

Tetrametil 2,2'-((1E,1'E)-(2-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ureido)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))ditereftalato (BPSU)

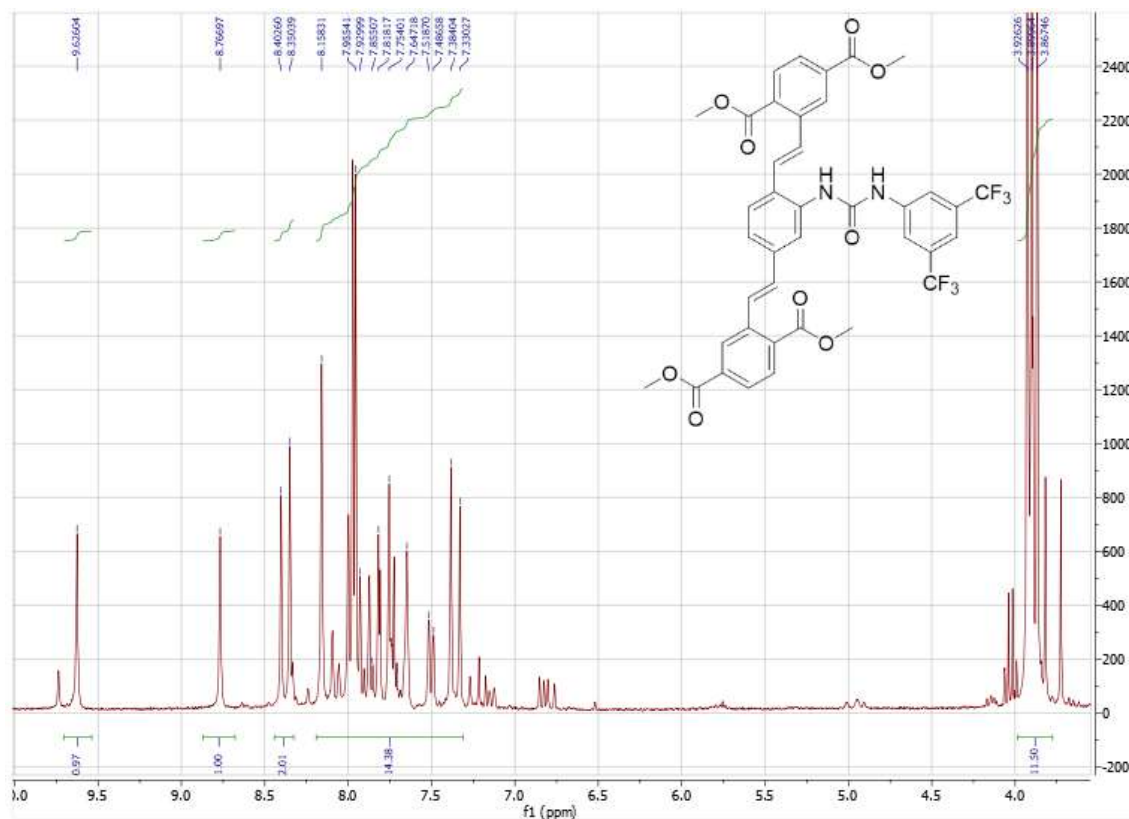


Figura 198. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6) de la tetrametil 2,2'-((1E,1'E)-(2-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ureido)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))ditereftalato (BPSU). Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

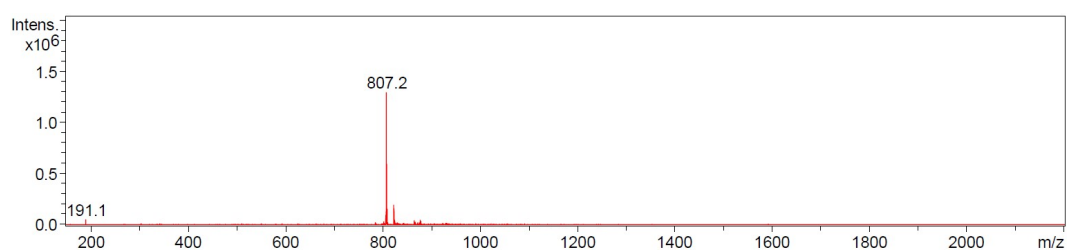


Figura 199. Espectro de masas de la tetrametil 2,2'-((1E,1'E)-(2-(3-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)ureido)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))ditereftalato (BPSU), realizado por electroespray en modo positivo. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{39}\text{H}_{30}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}^+$ 807.2 encontrado 807.2. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2

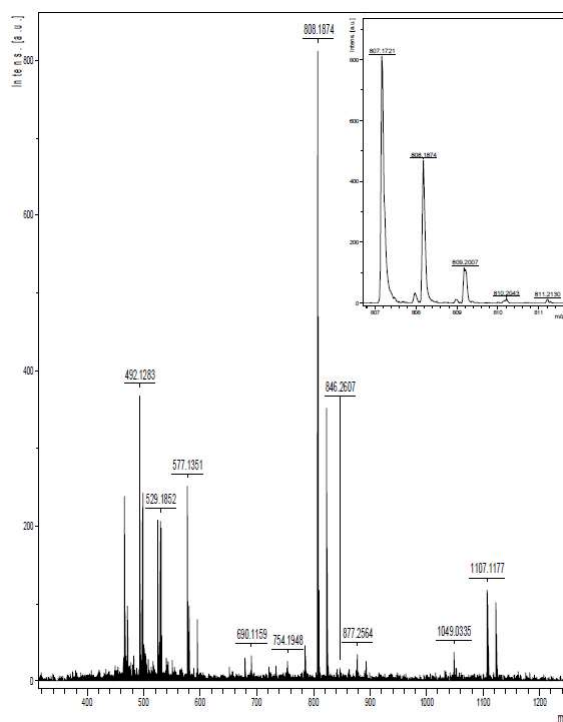


Figura 200. Espectro de masas de alta resolución de la de la tetrametil 2,2'-((1E,1'E)-(2-(3-(3,5-bis(trifluorometil) fenil)ureido)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))ditereftalato (BPSU), realizado por ionización láser asistida por matriz (MALDI) midiendo el tiempo de vuelo. $[M+Na]^+$ calculado para $C_{39}H_{30}F_6N_2O_9Na^+$ 807.1721 encontrado 817.1753. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

Monómeros de CLPs

2-(2-metoxietoxi)etil 4-metilbencenosulfonato (TsOR)

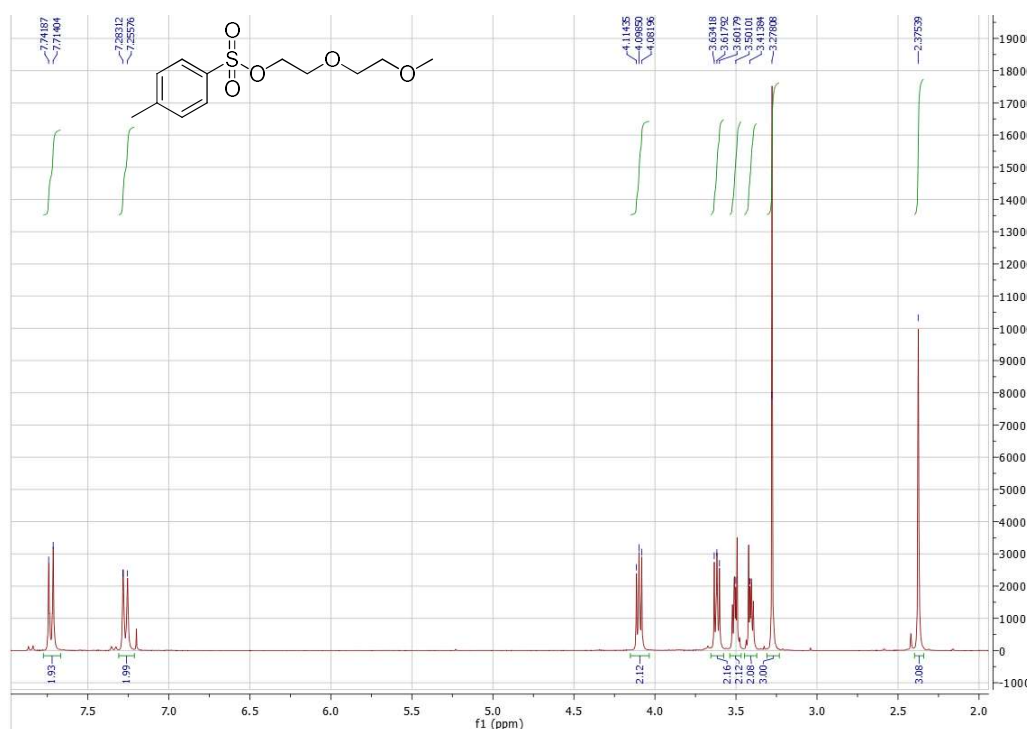


Figura 201. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del 2-(2-metoxietoxi)etil 4-metilbencenosulfonato. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

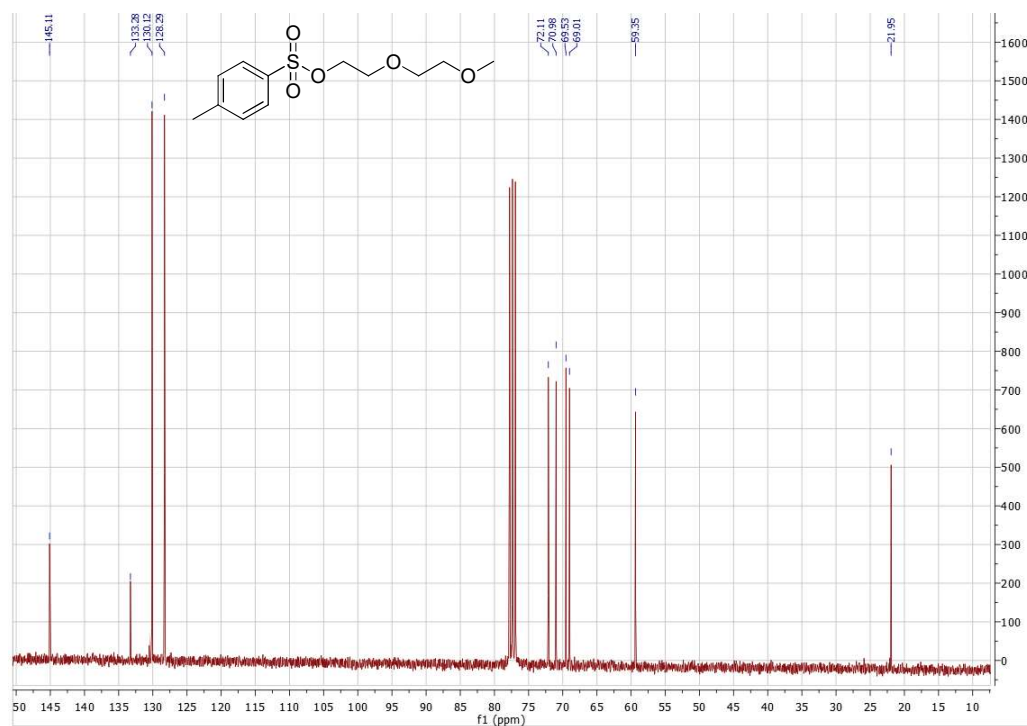


Figura 202. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) del 2-(2-metoxietoxi)etil 4-metilbencenosulfonato. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

1,4-diyodo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno (dIB)

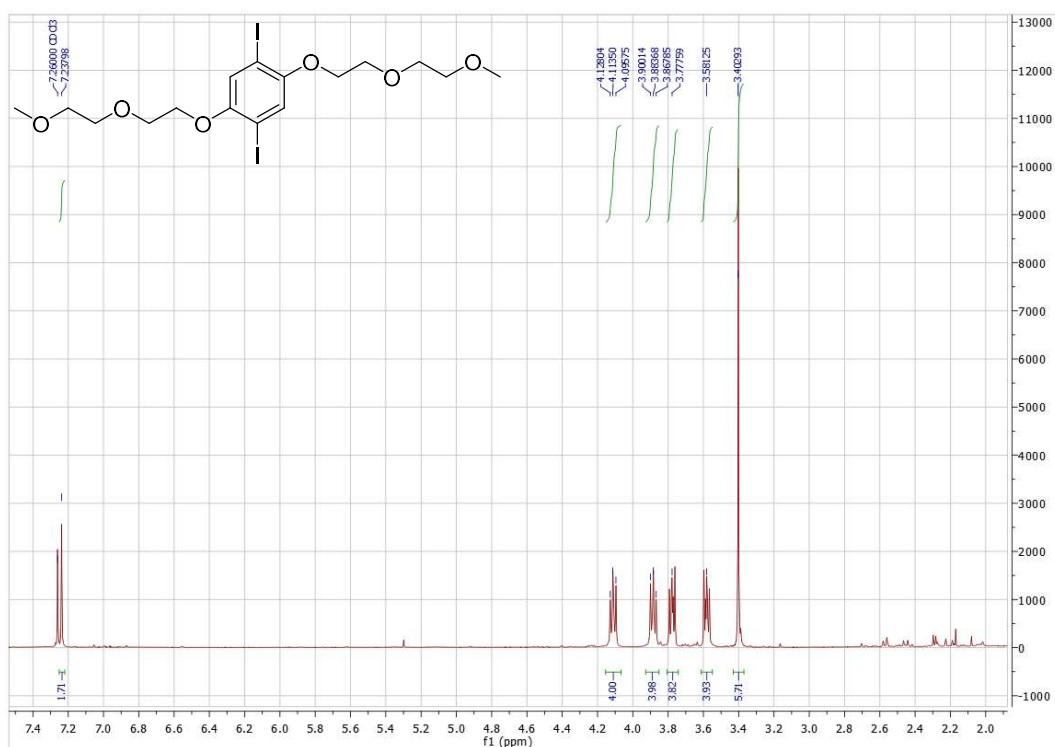


Figura 203. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del 1,4-diyodo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

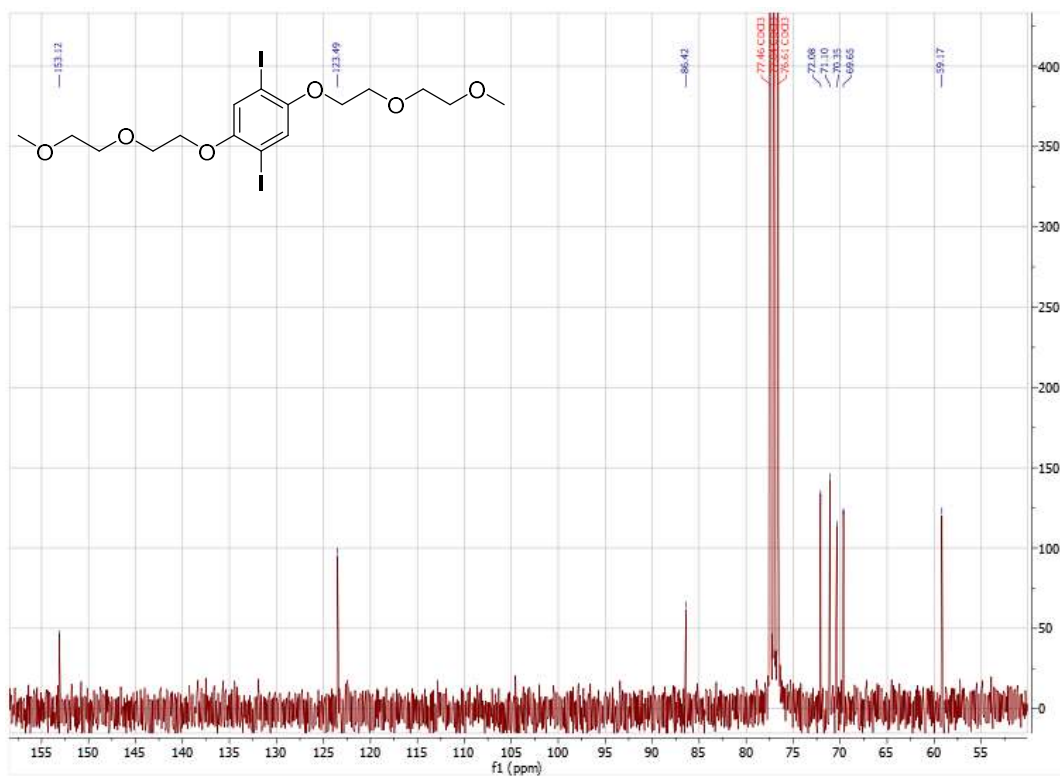


Figura 204. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) del 1,4-diyodo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

1,4-dibromo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno (dBrB)

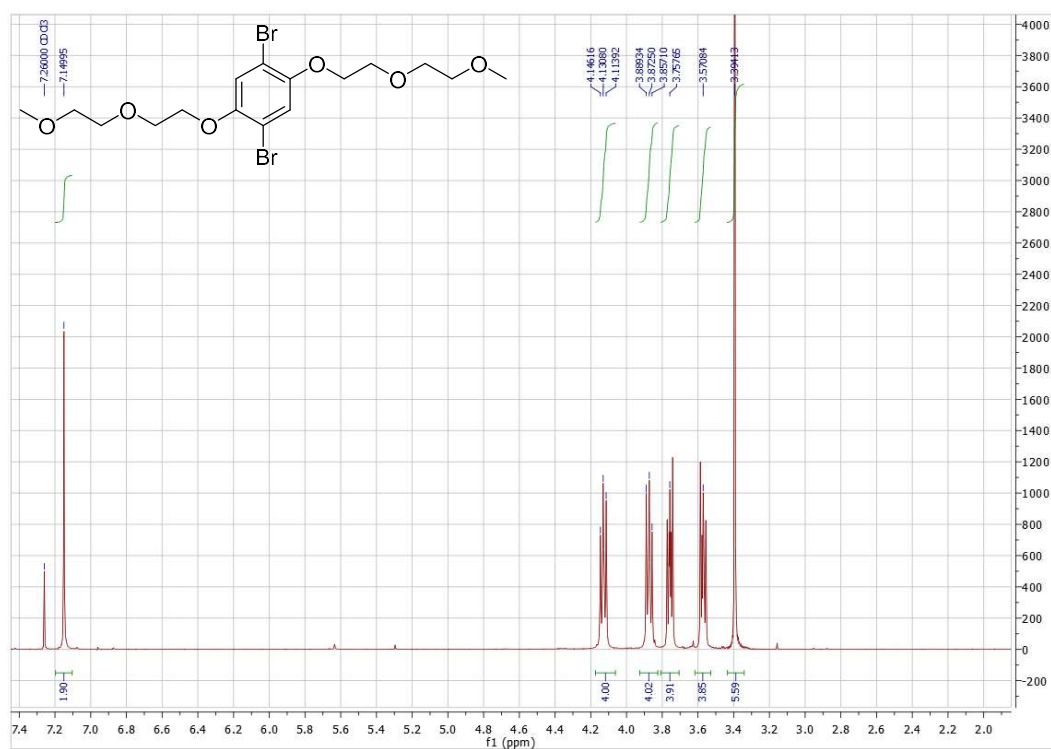


Figura 205. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del 1,4-dibromo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

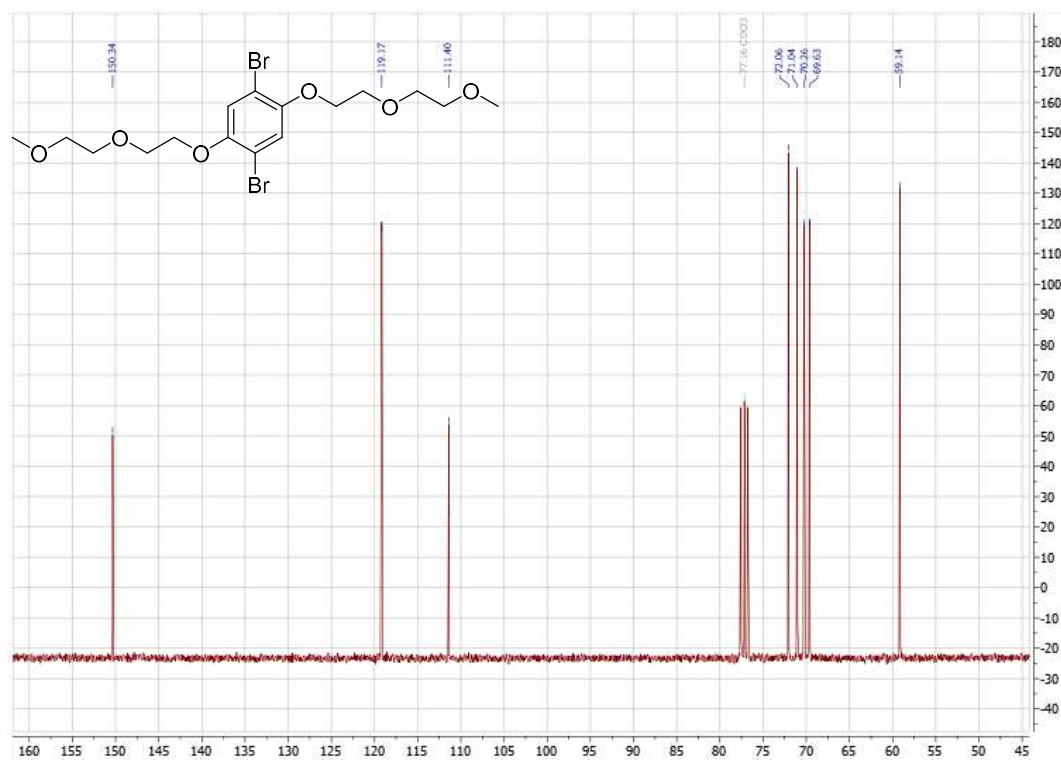


Figura 206. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) del 1,4-dibromo-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

((2,5-bis(2-(2-metoxetox)etoxi)-1,4-fenileno)bis(etin-2,1-diil)) bis(trimetilsilano) (4.5)

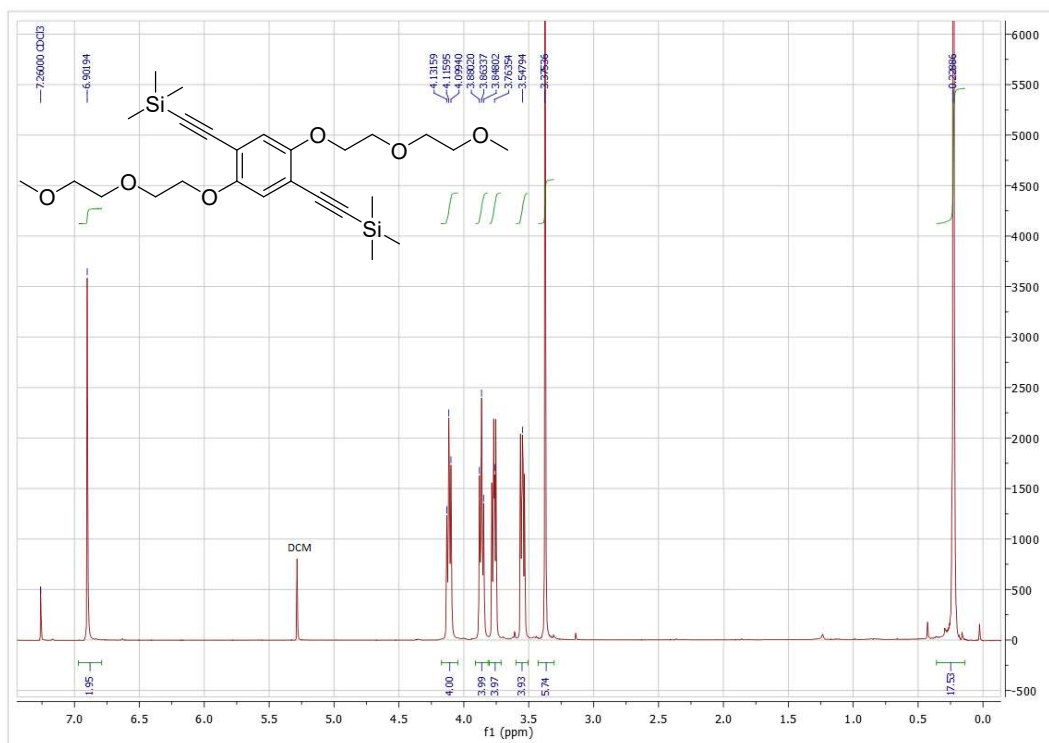


Figura 207. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del ((2,5-bis(2-(2-metoxetox)etoxi)-1,4-fenileno)bis(etin-2,1-diil)) bis(trimetilsilano). Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

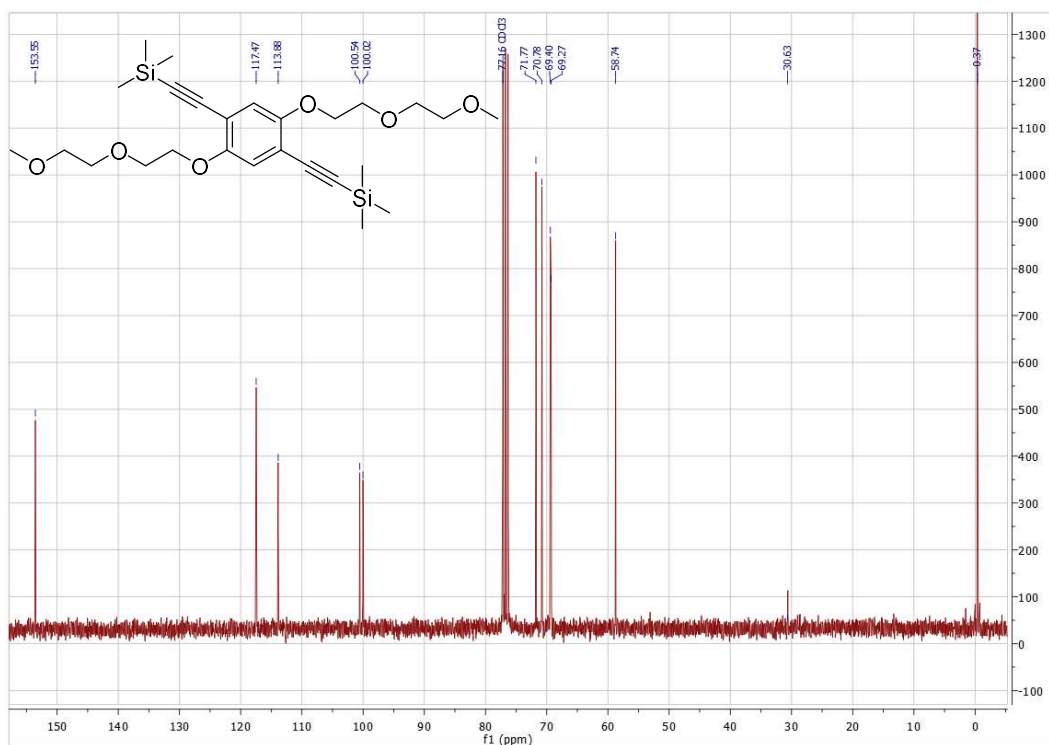


Figura 208. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) del ((2,5-bis(2-(2-metoxetox)etoxi)-1,4-fenileno)bis(etin-2,1-diil)) bis(trimetilsilano). Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

1,4-dietinil-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno (4.6)

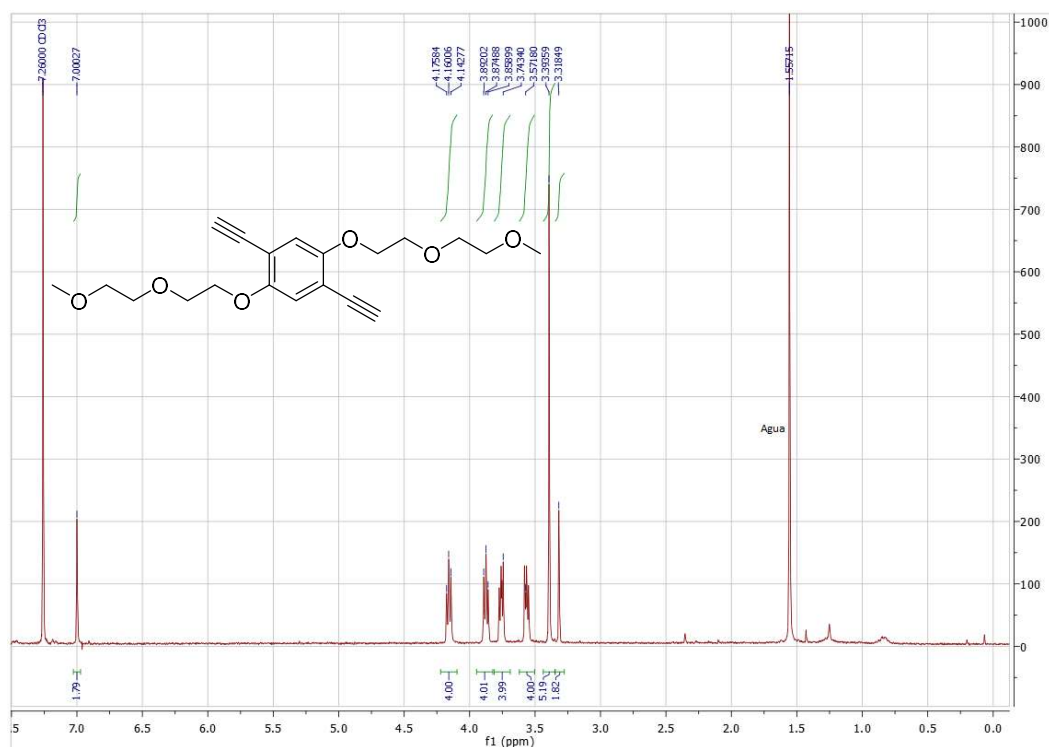


Figura 209. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del 1,4-dietinil-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

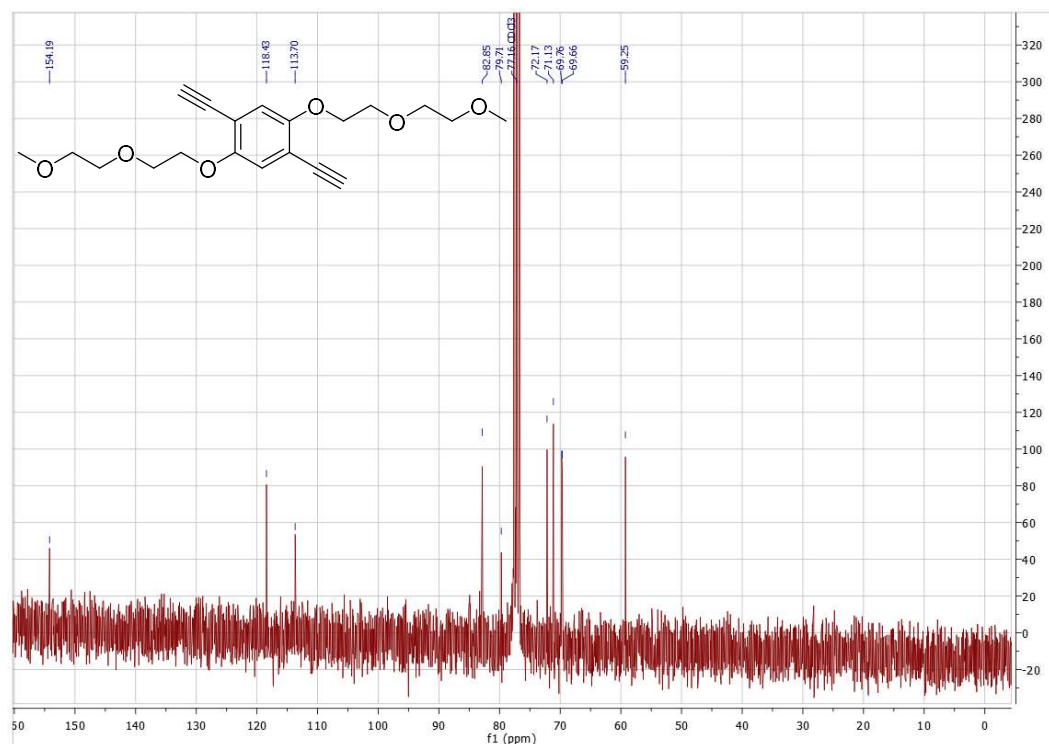


Figura 210. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) del 1,4-dietinil-2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)benceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

2,2'-((1E,1'E)-(2,5-bis(2-(2-metoxietoxi)etoxi)-1,4-fenileno)bis(eteno-2,1-diil))bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano) (BEB)

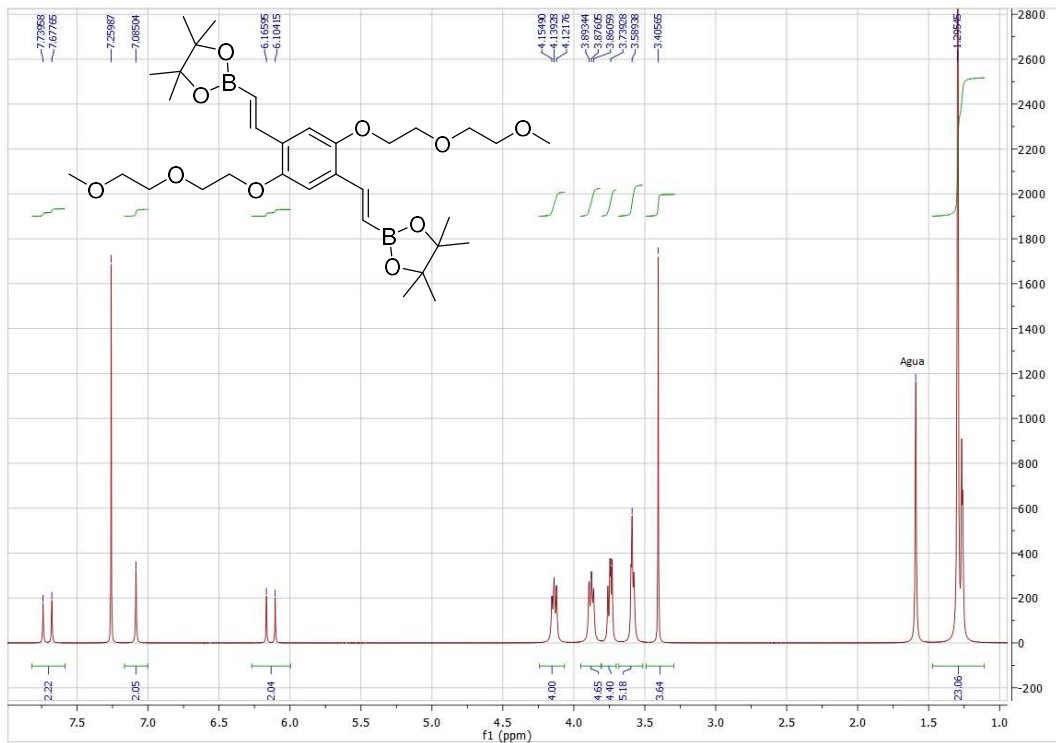


Figura 211. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de BEB. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

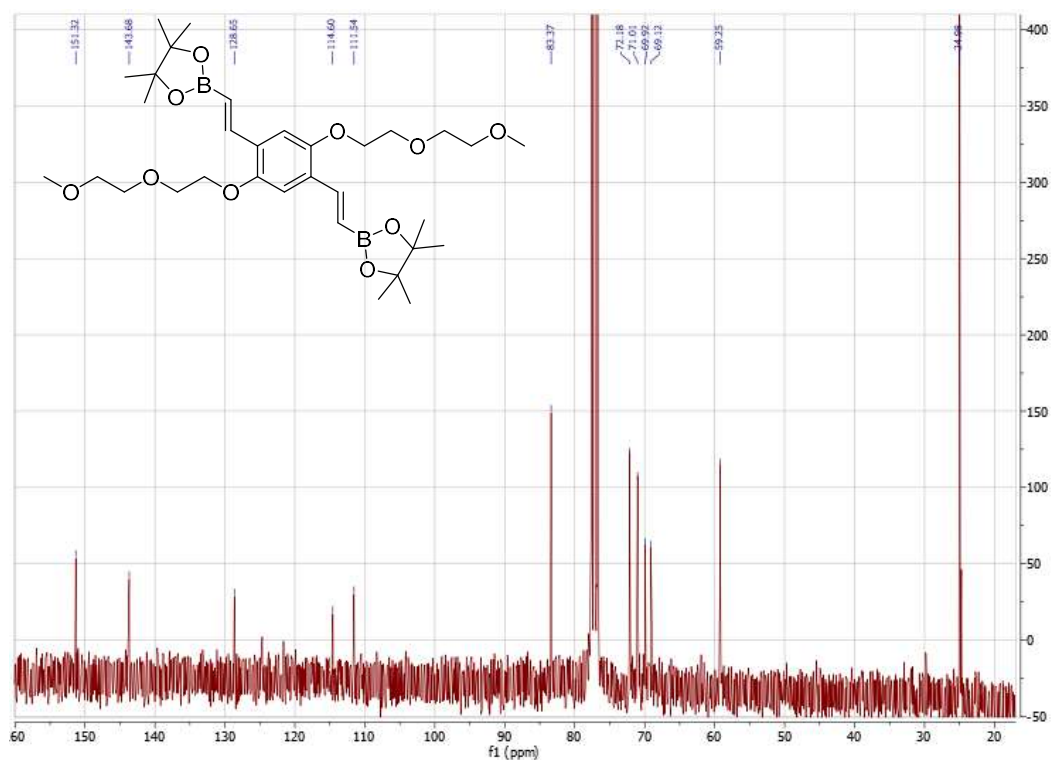


Figura 212. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) de BEB. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

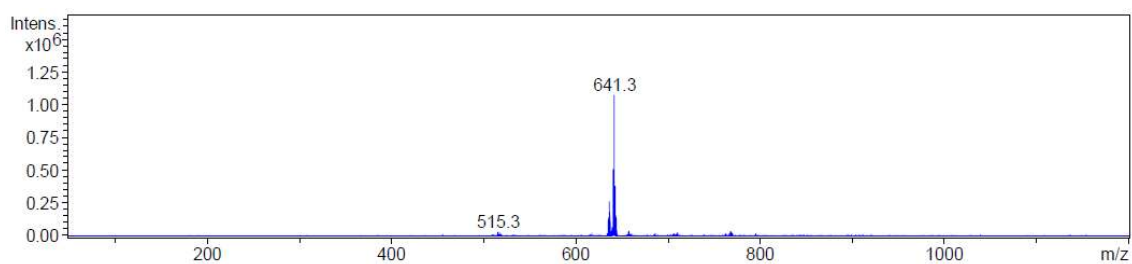


Figura 213. Espectro de masas de BEB, realizado por electrospray en modo positivo. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{B}_2\text{O}_{10}\text{Na}^+$ 641.3 encontrado 641.3. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

1,4-bis((trimetilsilil)etnil)benceno (4.8)

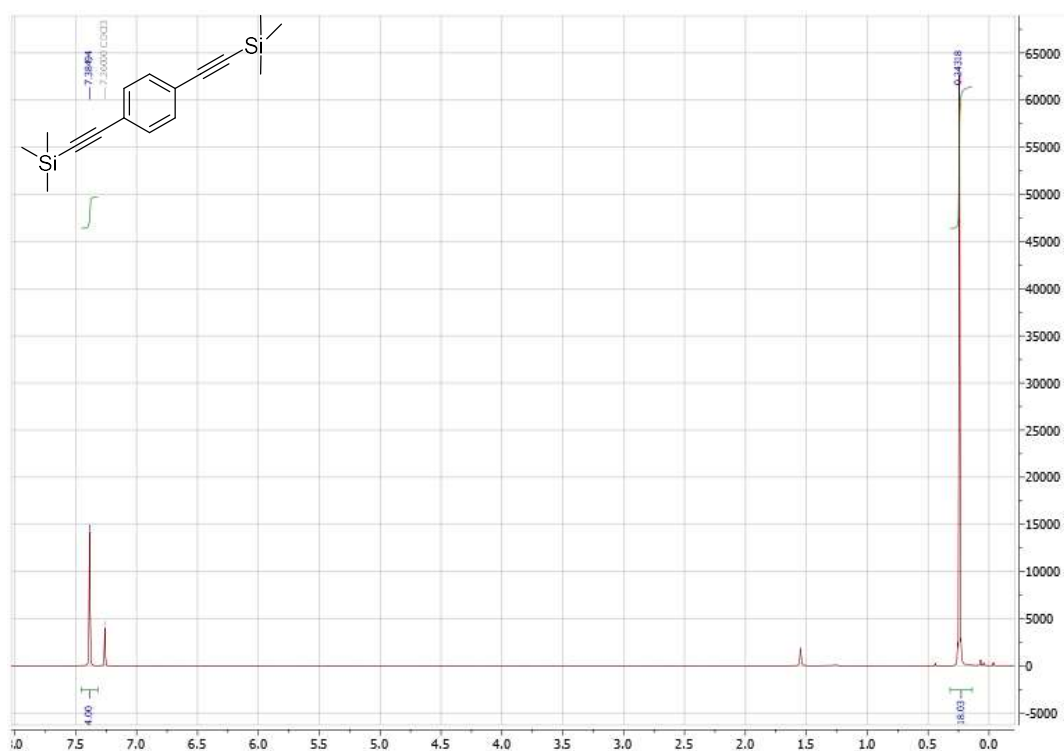


Figura 214. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del 1,4-bis((trimetilsilil)etnil)benceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

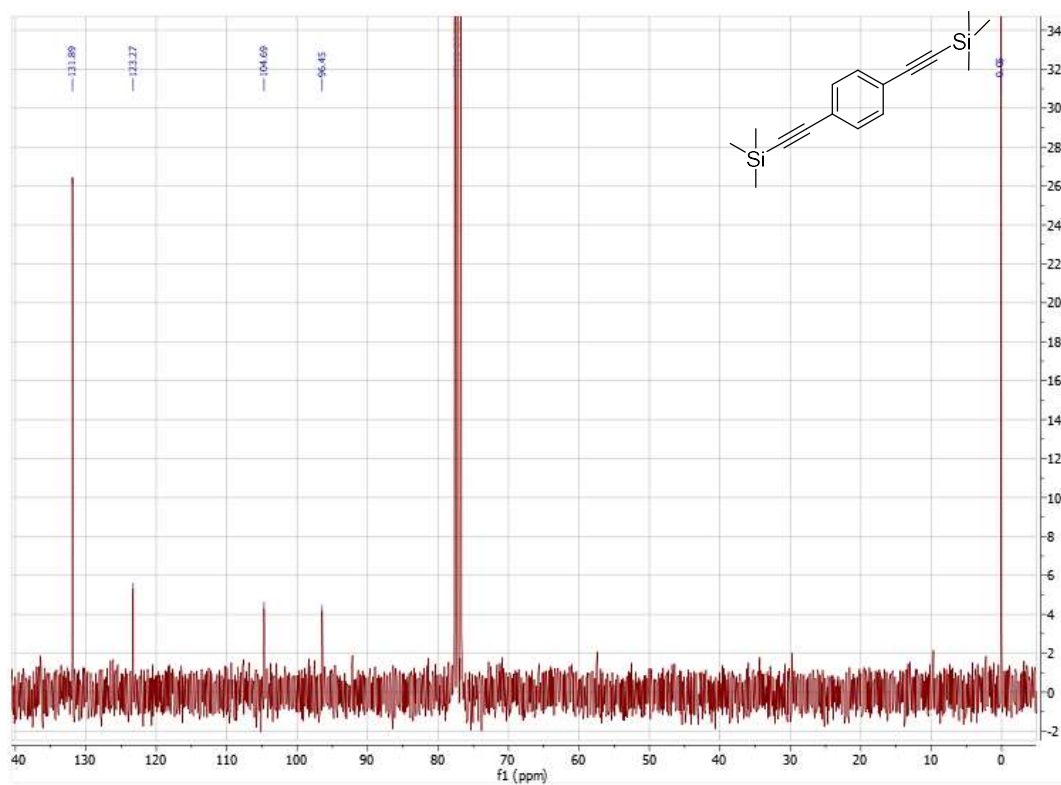


Figura 215. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) del 1,4-bis((trimetilsilil)etnil)benceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

1,4-dietinilbenceno (4.9)

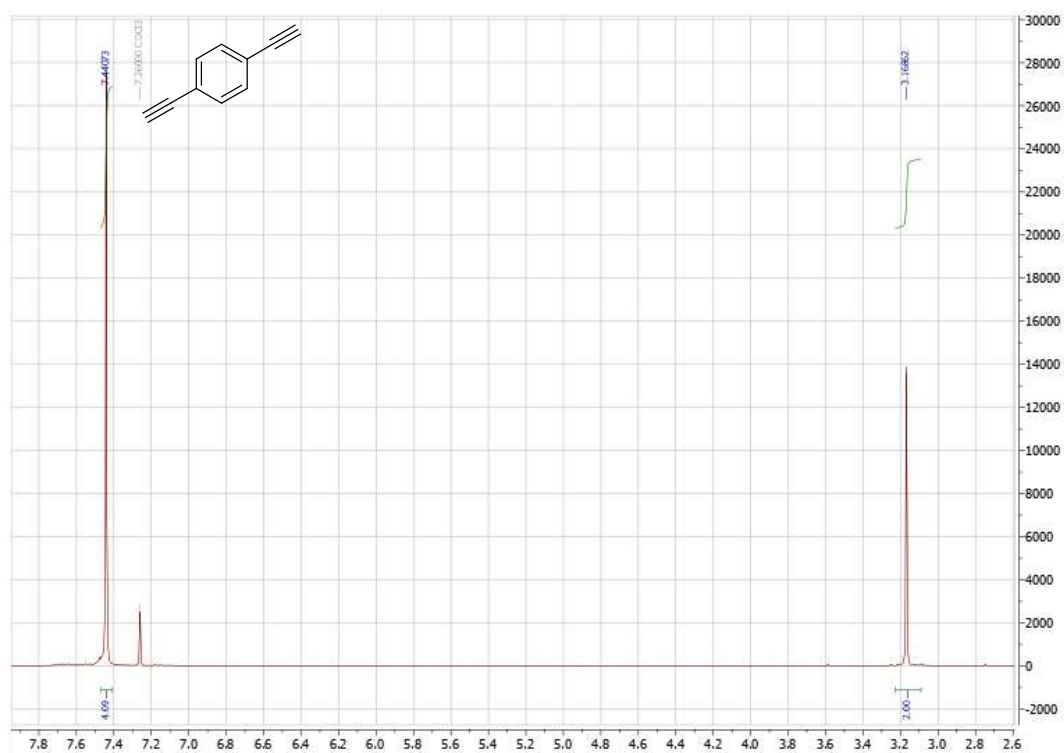


Figura 216. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del 1,4-dietinilbenceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

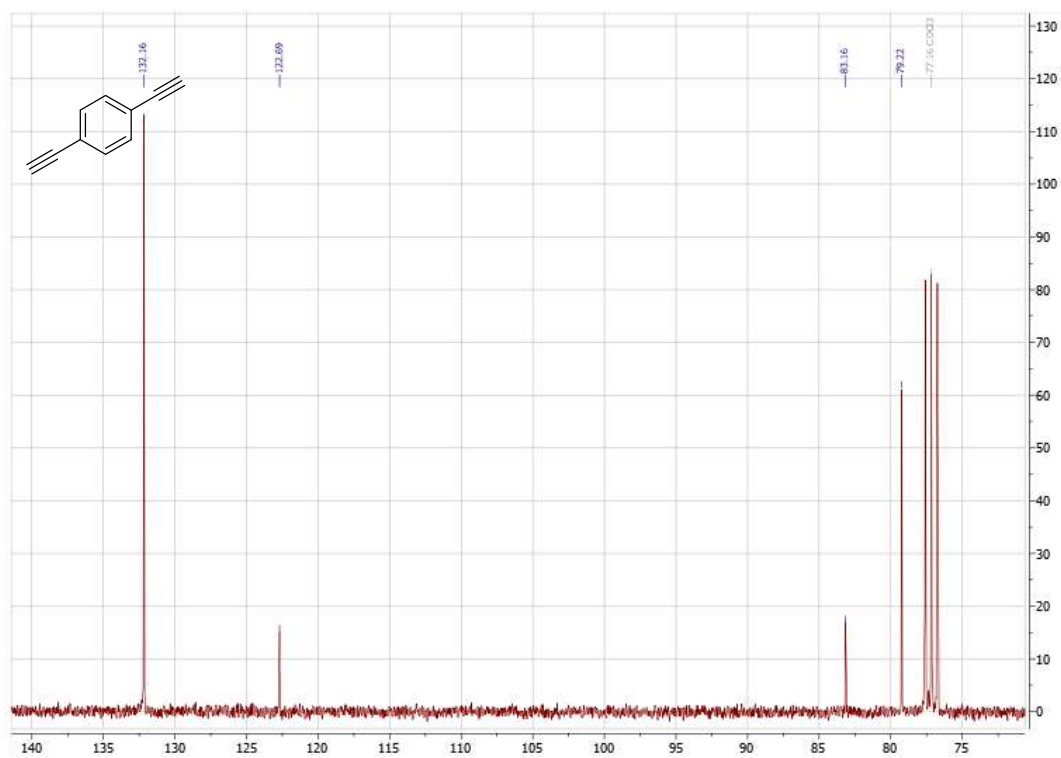


Figura 217. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) del 1,4-dietinilbenceno. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

1,4-bis((E)-2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)vinil) benceno (DVB)

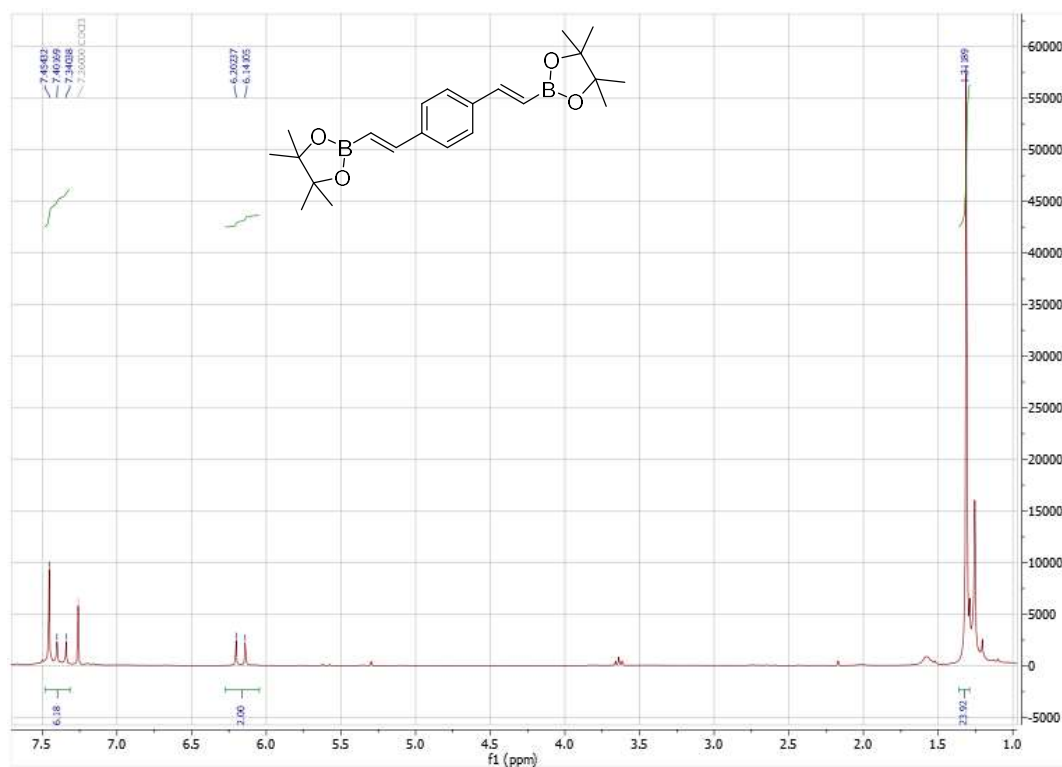


Figura 218. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del DVB. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

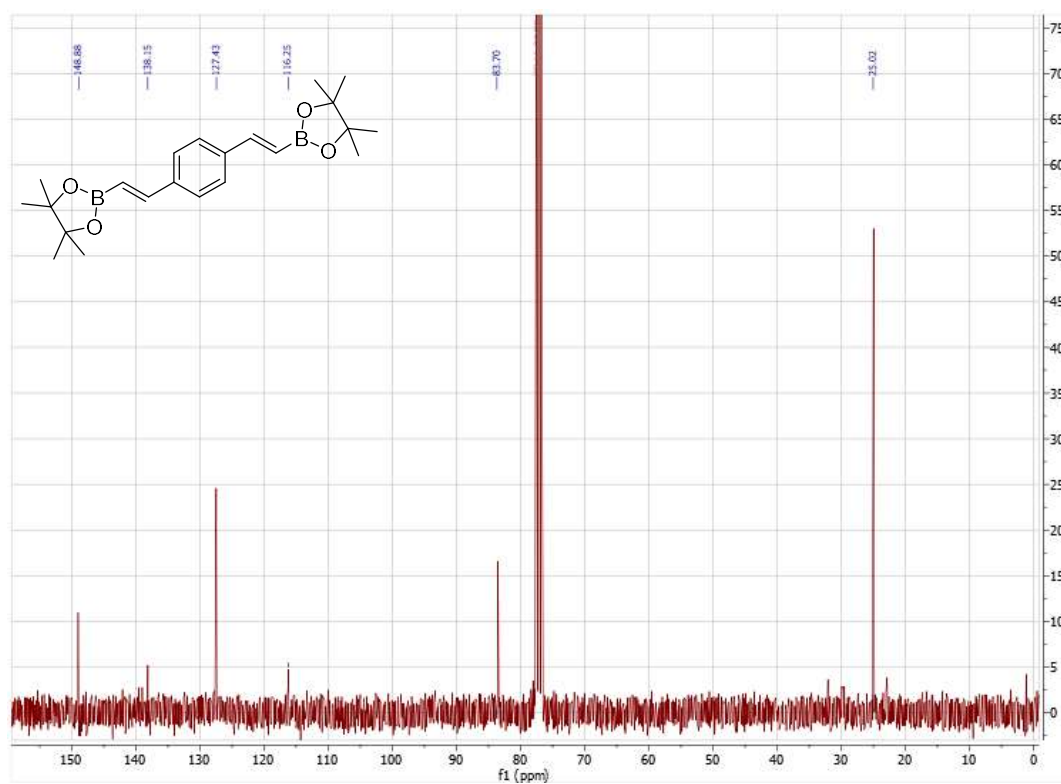


Figura 219. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) del DVB. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

2,6-dibromo-8-fenil-1,3,5,7-tetrametil-4,4'-difluoroboradizaindaceno (MBDPY)

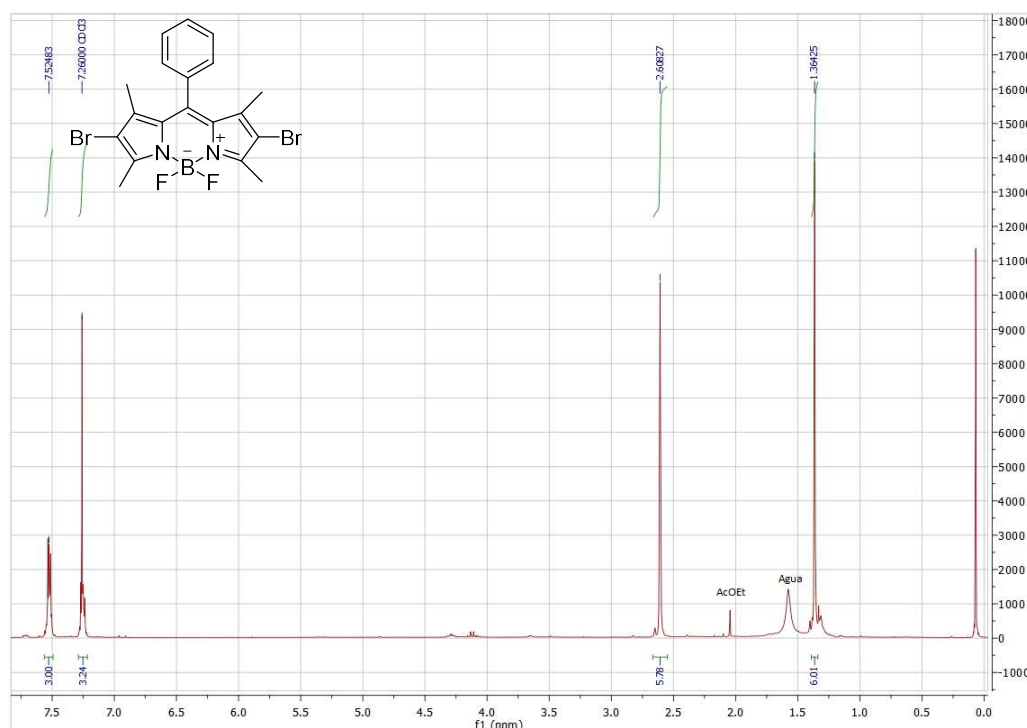


Figura 220. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del monómero BODIPY MBDPY. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

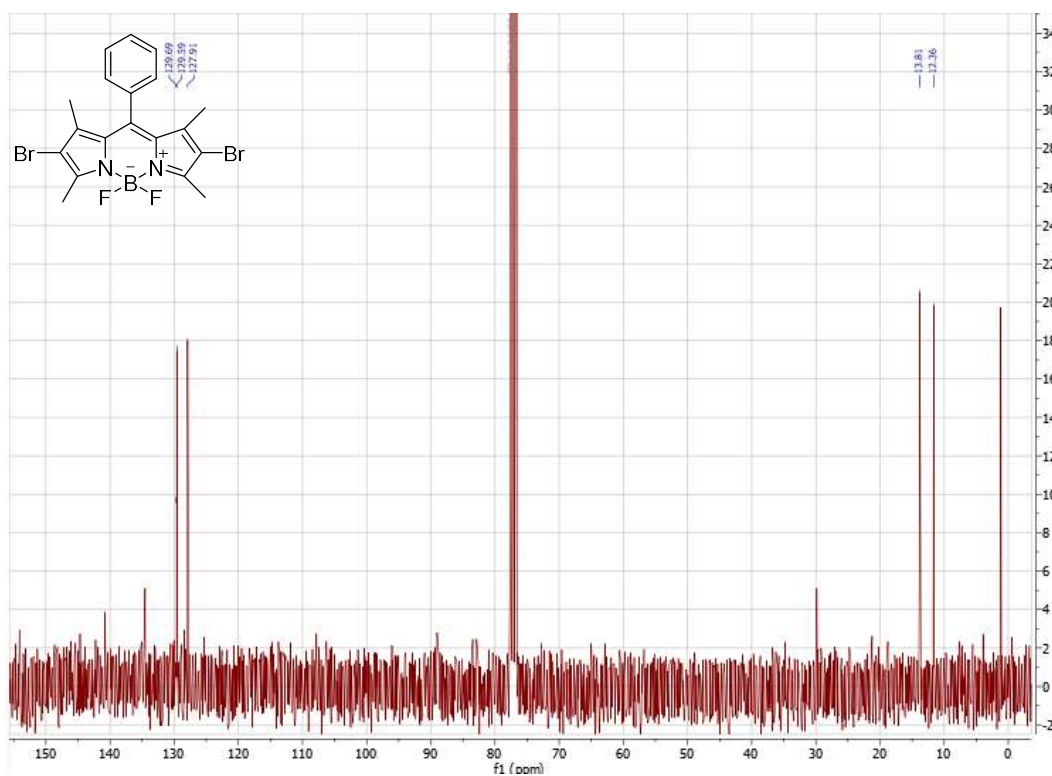


Figura 221. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) del monómero BODIPY MBDPY. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 4.1.

1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)-3-(2,5-dibromofenil)urea (MU)

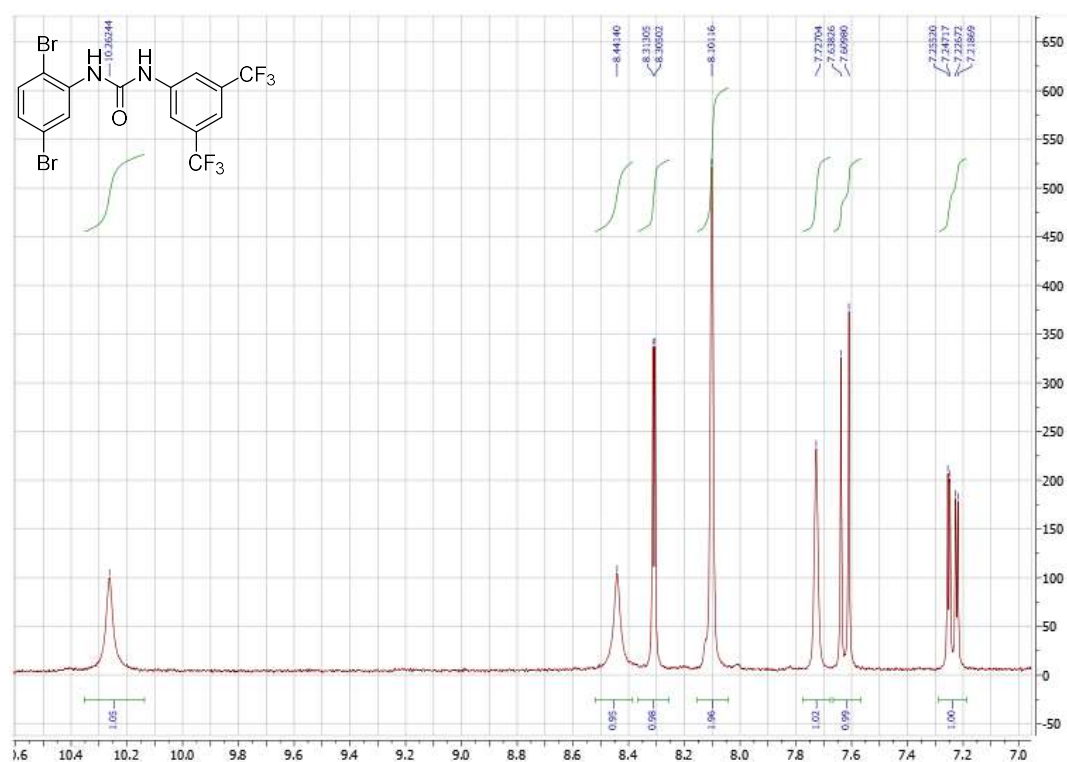


Figura 222. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) del monómero urea MU. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

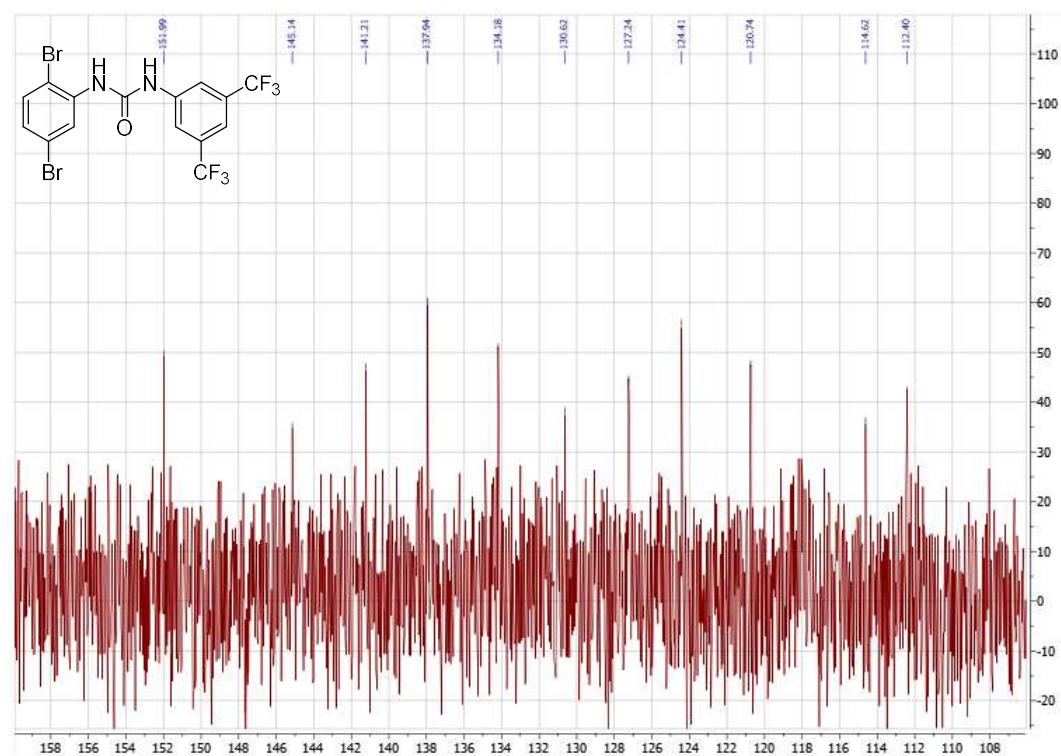


Figura 223. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆) del monómero urea MU. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

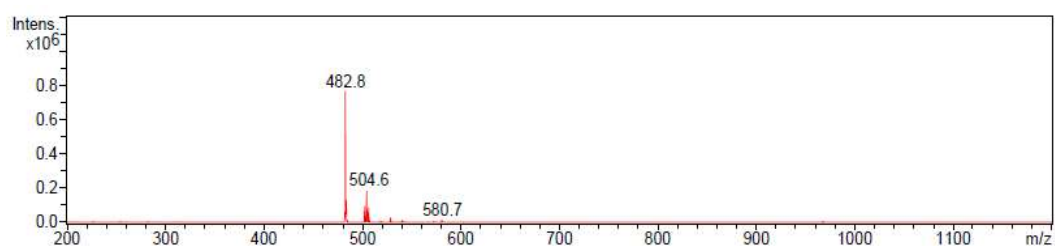


Figura 224. Espectro de masas del monómero urea MU, realizado por electrospray en modo positivo. $[M+H]^+$ calculado para $C_{15}H_9Br_2F_6N_2O^+$ 504.9 encontrado 504.6. Procedimiento de síntesis descrito en Parte Experimental, Sección 3.2.

Apéndice: Rendimiento cuántico de fluorescencia Φ_f

1.	OBJETIVOS.....	297
2.	RENDIMIENTO CUÁNTICO DE FLUORESCENCIA Φ_f	298
3.	METODOLOGÍA.....	300
4.	RESULTADOS	306
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	313

1. OBJETIVOS

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) es una propiedad clave que caracteriza la capacidad de un fluoróforo para convertir los fotones absorbidos en fotones emitidos en unas condiciones experimentales determinadas.¹⁻³ El producto de éste por el coeficiente de absorción molar en la longitud de onda de excitación utilizada ($\Phi_f \times \epsilon(\lambda_{\text{exc}})$) proporciona una medida del “brillo” (*brightness*) de un fluoróforo, valor que determina la sensibilidad analítica en determinaciones por fluorescencia.¹⁻² Por otra parte, la medida del Φ_f es de gran ayuda en el desarrollo de colorantes fluorescentes, indicadores, marcadores y sondas.² Además, los materiales de referencia con rendimientos cuánticos de fluorescencia verificados son esenciales en la aplicación de los métodos de fluorescencia, ya que el método más popular para la determinación de los Φ_f , denominado método relativo o método de Parker-Rees,⁴⁻⁵ se basa en la medida *relativa* de una muestra desconocida frente a un estándar de fluorescencia con valor de Φ_f conocido con precisión y exactitud.

Pese a la gran importancia de disponer de materiales de referencia con valores de Φ_f contrastados y fiables, se pueden encontrar en la bibliografía valores muy dispares de este observable para un mismo compuesto. Por ejemplo, en el caso de la Rodamina B en etanol (un conocido fluoróforo), se han descrito valores que van desde 0.73⁶ a 0.99.^{7,2} En algunos casos se están utilizando valores determinados hace más de 40 años que, sin asumir a priori que son de baja calidad, no se benefician de los importantes avances tecnológicos en la medida de la radiación luminosa y en las técnicas de determinación del grado de pureza de los compuestos químicos utilizados (sin ir más lejos en este mismo estudio se emplearon valores determinados en los años 80⁸⁻⁹ e incluso anteriores¹⁰⁻¹¹). De esta necesidad, surge el proyecto auspiciado por el Subcomité de Fotoquímica de la División de Química Orgánica y Biomolecular de la IUPAC en el que hemos participado. El proyecto ha consistido en la determinación y comparación interlaboratorio de los valores del rendimiento cuántico de fluorescencia (fosforescencia en algún caso) de 20 fluoróforos cuidadosamente seleccionados, de forma que abarquen un rango espectral comprendido entre los 200 nm y los 800 nm aproximadamente (UV-VIS-NIR).

Los principales objetivos del proyecto multinacional han sido:

- Obtener información sobre la reproducibilidad y la variabilidad entre laboratorios de las mediciones de Φ_f "de rutina", utilizando métodos absolutos y relativos
- Ampliar la oferta de estándares comerciales, utilizables sin purificación adicional, para la medición de Φ_f por el método relativo

2. RENDIMIENTO CUÁNTICO DE FLUORESCENCIA Φ_f

Actualmente la fluorescencia se utiliza como herramienta analítica en diferentes áreas tales como la ciencia de los materiales, análisis ambiental, bioanálisis, genética molecular, biología celular, diagnóstico médico y selección de fármacos, entre muchos campos.^{1-2, 12} Esta técnica ofrece una información multiparamétrica: medida de intensidad de fluorescencia, posiciones espectrales de los máximos de emisión y excitación, grado de polarización de la luz emitida —cuándo se excita con luz polarizada— y tiempo de vida de la emisión. Además, es fácil de utilizar, relativamente económica, mínimamente invasiva, permite la accesibilidad remota gracias al uso de las fibras ópticas y es una técnica tan sensible que permite la detección de moléculas y fotones individuales. Su selectividad intrínseca con respecto a los parámetros experimentales derivados de la selección de las λ_{EM} y λ_{EXC} , hacen de la fluorescencia una técnica ampliamente utilizada, y no sólo como técnica de análisis, sino como herramienta en investigación en muchos campos de la Física, Química o Medicina por ejemplo.¹²

El parámetro que permite evaluar y comparar cuantitativamente la fluorescencia de los diferentes compuestos es el *rendimiento cuántico* de fluorescencia que se define según la **ecuación A.1**, como el número de fotones emitidos respecto al número de fotones absorbidos (en idéntico tiempo) y su valor varía entre 1, para moléculas altamente fluorescentes, y 0 para especies que no presentan fluorescencia apreciable.

$$\Phi_f = \frac{\text{fotones emitidos}/t}{\text{fotones absorbidos}/t} \quad (\text{A.1})$$

Su determinación puede llevarse a cabo, principalmente, mediante dos métodos: i) el método *absoluto*, el cual implica la medida de toda la radiación emitida por el compuesto tras haber sido excitado, y ii) método *relativo* o de Parker-Rees, que es el método más empleado debido a su sencillez. Se basa en comparar la fluorescencia de la muestra con la de materiales patrón, cuyo rendimiento cuántico de fluorescencia se ha medido por el método absoluto. También existen otros métodos para la determinación Φ_f como los calorimétricos, pero su uso está mucho menos extendido.⁵

El método absoluto hace uso de lo que se conoce como esfera integradora (**Figura 225**). Este dispositivo está fabricado con un material fluoropolimérico (e.g. Spectralon®)¹³ que se caracteriza por tener una alta reflectancia (aproximadamente del 95%) y está diseñado en forma esférica para recoger la emisión de luz de la muestra desde todos los ángulos. Gracias al alto nivel de reflectancia que presenta la esfera integradora, toda la luz que entra en ella solo puede seguir dos caminos: 1) la absorción por parte de la muestra o 2) la recolección óptica por el detector del fluorímetro. De esta forma, por una parte se determina el número de fotones

absorbidos por la muestra como la diferencia entre el número de fotones que emite la fuente de iluminación y el número de fotones que llega al detector y, por otra, los fotones emitidos que son recolectados por la esfera integradora que los focaliza todos en el detector para su cuantificación.⁵ La gran ventaja de este método es que, al no necesitar sustancias patrones, es el único que permite determinar el Φ_f de emisores en el IR, para los cuales no existen estándares. También es el único que permite la medida de Φ_f de partículas con fluorescencia por “conversión hacia arriba” (*up-conversion*), así como de sustancias sólidas y muestras con un alto grado de dispersión de la luz.¹ Sin embargo la necesidad del uso de metodologías e instrumentos más sofisticados y de mayor coste hace que el método absoluto se use menos que el método relativo.^{2-3, 5}

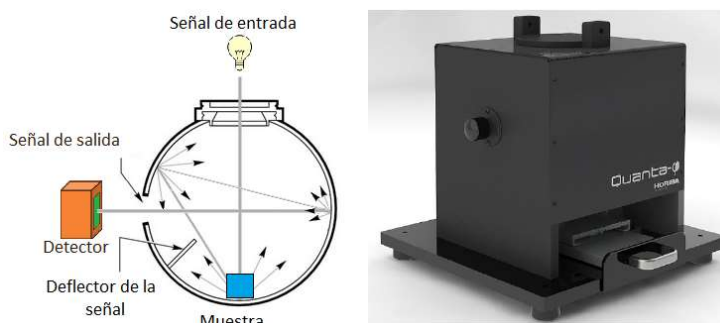


Figura 225. Izquierda: Esquema de una esfera integradora. Derecha: Aspecto exterior que presenta una esfera integradora de radiación situada fuera de un espectrofluorímetro.

El fundamento del método relativo para determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia se basa en comparar la intensidad de luz emitida,¹ medida como la integral del espectro de emisión de una muestra y de un compuesto patrón (I_x o I_p ; siendo x la muestra y p el patrón, **ecuación A.2**), registrados en idénticas condiciones experimentales y con idéntica absorbancia a la longitud de onda de excitación (idéntica para ambos). La relación entre ambas es proporcional a la relación de los rendimientos cuánticos de dichos compuestos en disolución. Pese a que en un espectrofluorímetro sin esfera integradora, tan sólo una pequeña fracción de la luz emitida por la muestra alcanza el detector, esta luz que llega es proporcional a la luz emitida y, dado que el método utiliza la relación de intensidades entre el patrón y la muestra determinadas en condiciones idénticas, puede emplearse el espectro de emisión como estimación de la emisión total de fluorescencia. Por su parte, la fracción de luz de excitación que absorbe la muestra se determina fácilmente a partir de la medida de la absorbancia a la longitud de onda de excitación con un espectrofotómetro (A_x o A_p en la **ecuación A.2**). Si el patrón y la muestra a determinar se encuentran disueltos en distintos disolventes es necesario introducir un factor de corrección n_x/n_p (**ecuación A.2**) basado en los índices de refracción respectivos. De esta forma, la ecuación

general (**ecuación A.1**) para la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia para una sustancia “x” (Φ_f^x) a partir del rendimiento cuántico de fluorescencia de un patrón conocido (Φ_f^p) por el método relativo es (**ecuación A.2**)⁴:

$$\Phi_f^x = \Phi_f^p \left[\frac{I_x}{I_p} \right] \left[\frac{A_p}{A_x} \right] \left[\frac{n_x}{n_p} \right]^2 \quad (\text{A.2})$$

3. METODOLOGÍA

1. Precauciones.^{1, 3} A la hora de medir los espectros de absorción y emisión de los fluoróforos seleccionados por el consorcio de laboratorios participantes, se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones:

- La temperatura se mantuvo constante a (25 ± 1) °C ya que los espectros de emisión se pueden ver afectados por la temperatura
- Algunos fluoróforos son sensibles a la presencia de oxígeno; aun así, en el proyecto se decidió no desoxigenar ninguna muestra para incrementar la generalidad del método, si bien se realizaron medidas de la presión atmosférica y humedad para poder realizar una estimación si fuese necesario de la cantidad de oxígeno disuelto en la muestra
- Similitud del rango espectral del estándar y las muestras
- Pese a que la ecuación de Parker-Rees ya contempla el factor de corrección al dividir la fluorescencia por la absorbancia a la λ_{EXC} , para minimizar la introducción de errores es aconsejable:
 - Igualar las absorbancias a la longitud de onda de excitación del estándar y de las muestras lo máximo posible (típicamente mejor que 0.01 unidades de absorbancia)
 - excitar en picos o valles, zonas donde la absorbancia no varíe drásticamente
- Utilizar disoluciones diluidas desde el punto de vista óptico (típicamente $A_{\text{EXC}} < 0.1$) para evitar efectos de filtro interno y/o de reabsorción de luz
- Excitar a longitudes de onda que permitan recoger la totalidad de la banda de emisión de la muestra

2. Fluoróforos. Para la elección de los fluoróforos se siguieron los siguientes criterios:

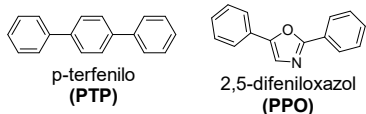
- La existencia de datos suficiente de Φ_f en la bibliografía^{1-2, 8-11, 14-15}
- Preferiblemente con espectros de absorción amplios
- Fotoestabilidad

- Disponibilidad comercial en suficiente grado de pureza
- Cobertura del rango espectroscópico UV-VIS-NIR

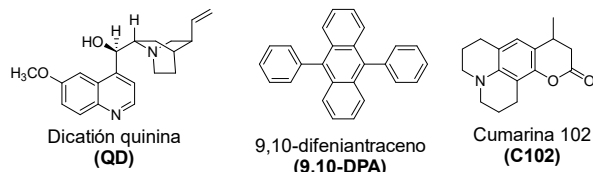
Todos los grupos que participaron en el proyecto disponían del mismo lote de fluoróforo comercial (en algún caso como el $\text{Ru}(\text{bpy})_3(\text{PF}_6)_2$, preparado por uno de los laboratorios), para evitar las posibles desviaciones derivadas de usar diferentes lotes de producto.

Debido al amplio rango espectral cubierto, fue necesario clasificar los distintos fluoróforos en 8 grupos, en función de la λ_{exc} y rango de λ_{em} , para poder emplear un mismo estándar por grupo: **Grupo 1:** *p*-terfenilo (PTP), 2,5-difeniloxazol (PPO); **Grupo 2:** dicación quinina (QD), 9,10-difenilantraceno (9,10-DPA), cumarina 102 (C102); **Grupo 3:** cumarina 153 (C153), dihexafluorofosfato de tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3$), cumarina 6 (C6); **Grupo 4:** fluoresceína (FLC), 4-(dicianometilen)-2-metil-6-(4-dimetilaminostiril)-4*H*-pirano (DCM_{dye}), naranja de perileno (NarPer); **Grupo 5:** rodamina 6G (R6G), eritrosina B (ErB), naranja de perileno (NarPer); **Grupo 6:** rodamina 101 (R101), rojo de perileno (RojPer), tetrafenilporfirina de zinc(II) (ZnTPP); **Grupo 7:** perclorato de violeta de cresilo (CV), perclorato de oxazina 170 (Ox170) y **Grupo 8:** perclorato de oxazina (Ox1), ftalocianina de zinc(II) (ZnPTC). Las estructuras de todos ellos se muestran en la **Figura 226**.

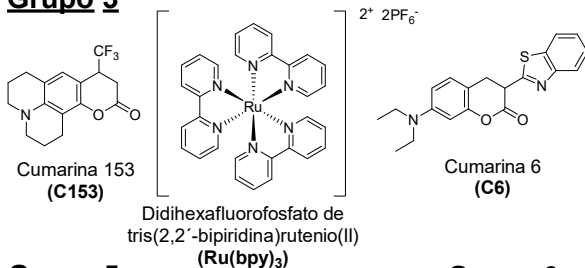
Grupo 1



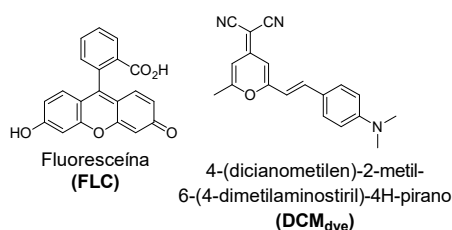
Grupo 2



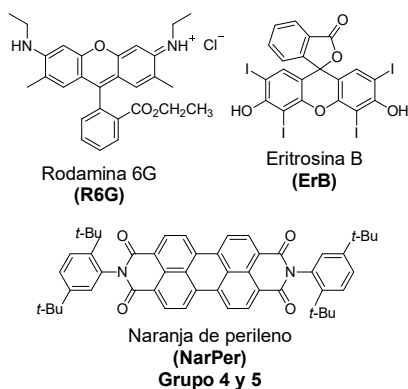
Grupo 3



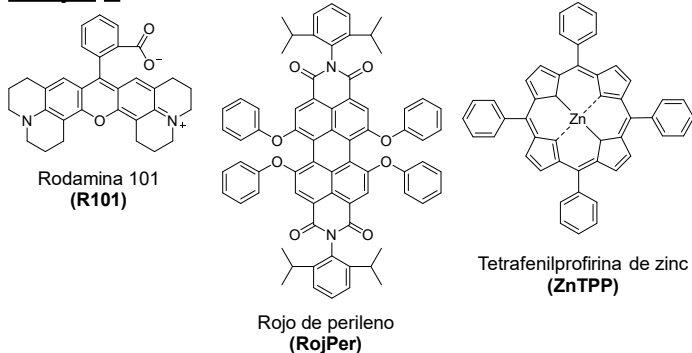
Grupo 4



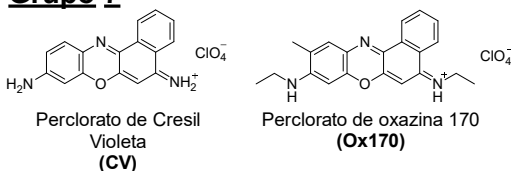
Grupo 5



Grupo 6



Grupo 7



Grupo 8

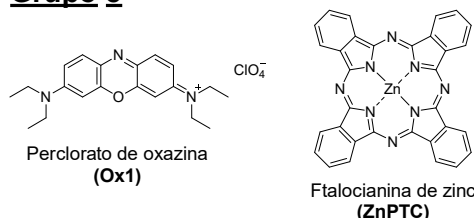


Figura 226. Estructuras químicas de los diferentes fluoróforos (luminóforo en el caso del complejo de $\text{Ru}(\text{II})$ con 2,2'-bipiridina) empleados para el estudio de determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia, clasificados según grupos del 1 al 8.

3. Preparación de las muestras. Para cada fluoróforo se preparó una disolución madre (*stock*) ca. $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (ver **Tabla 12** para los valores de concentración en cada caso, $\pm 1\%$). La cantidad de fluoróforo necesaria para lograr dicha concentración se disolvió en 10.0 mL del disolvente correspondiente. En el caso de no obtener una disolución completamente transparente se aumentó la cantidad de disolvente. En cuatro casos (ErB y $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ en agua, DCM_{dye} y NarPer) las disoluciones tuvieron que ser filtradas utilizando una jeringa a través de un filtro de nylon de $0.2 \mu\text{m}$.

Tabla 12. Serie de fluoróforos empleados, clasificados en ocho grupos (en negrita, el **patrón** para cada grupo) y concentración de las disoluciones madre empleadas para la determinación de Φ_f .

GRUPO	MUESTRA	DISOLVENTE	CONCENTRACIÓN (MOL L ⁻¹)
1	PTP	Ciclohexano	0.43
1	PPO	Metanol	0.37
2	QD	HClO ₄ 0.1 M	0.40
2	9,10-DPA	Ciclohexano	0.39
2	C102	Etanol	0.40
3	C153	Etanol	0.42
3	Ru(bpy) ₃	Agua	desconocida ^a
3	Ru(bpy) ₃	Acetonitrilo	0.39
3	C6	Etanol	0.18
4	FLC	NaOH 0.1 M	0.39
4	DCM _{dye}	Etanol	desconocida ^a
4, 5	NarPer	Cloroformo	desconocida ^a
5	R6G	Etanol	0.40
5	ErB	Agua	desconocida ^a
5	ErB	Metanol	0.40
6	R101	Etanol	0.41
6	RojPer	Cloroformo	0.40
6	ZnTPP	Tolueno	0.42
7	CV	Etanol	0.38
7	Ox170	Etanol	0.26
8	Ox1	Etanol	0.39
8	Zn-PTC	Propanol	desconocida ^a

^a Debido a la baja solubilidad del fluoróforo fueron necesarias sucesivas diluciones y una filtración para evitar la presencia de agregados y/o partículas.

4. Protocolo de medida. Se añadieron 2.5 mL del disolvente puro (ver abajo) correspondiente en una cubeta para fluorescencia (ver abajo) para cada medida de absorción y emisión. Después de ajustar a cero la absorción del blanco registrando la línea base, se añadió una alícuota de la disolución madre (normalmente entre 1 y 100 μ L para conseguir una absorbancia a la longitud de onda de excitación de aproximadamente 0.1) a la misma cubeta y se registró el espectro de absorción para la molécula. Se intentó ajustar la intensidad de absorción en la longitud de onda de la excitación de tal manera que el valor de absorción del estándar y la muestra en cada grupo

fuese lo más próximo posible (en todo caso, mejor que 0.01). El valor de absorbancia para la longitud de onda de excitación siempre se mantuvo por debajo de 0.1. En el caso de los espectros de emisión, tras su registro, todos los espectros se corrigieron por la respuesta instrumental utilizando los factores de corrección proporcionados por Gilden Photonics (350 – 850 nm). Para cada fluoróforo se midieron 4 réplicas diferentes. Si alguno de los cuatro valores finales de Φ_f obtenidos diferían sustancialmente ($\geq 10\%$) dicho valor se descartó y se realizó la media con el triplicado.

3.1.- Cubetas:

En todos los casos se emplearon cubetas de sílice Suprasil® (Hellma 111-QS, 10 x 10 mm paso óptico) .

3.2.- Disolventes:

- Ciclohexano, CHROMASOLV $\geq 99.7\%$, Sigma Aldrich, 110-82-7, lote: SZBE255BV.
- Tolueno, ACS reagent $\geq 99.7\%$, Sigma Aldrich, 108-88-3, lote: SZBD318SV.
- Cloroformo, CHROMASOLV $\geq 99.8\%$, Sigma Aldrich, 67-66-3, lote: SZBE161MV.
- Acetonitrilo, far UV/gradient grade $\geq 99.9\%$, Alfa Aesar, 75-05-8, lote: 0643443.
- 1-Propanol, CHROMASOLV $\geq 99.9\%$, Sigma Aldrich, 71-23-8, lote: SZBE146MV.
- Etanol, multisolvent HPLC grade ACS ISO UV-VIS, Scharlau, 64-17-5, lote: 14532307.
- Metanol, HPLC grade 99.99 %, Fisher Scientific, 67-56-1, lote: 1408507.
- HClO_4 70%, 99.999% trace metal basis, Aldrich, 7601-90-3, lote: SHBD9853V.
- NaOH, 97%, Carlo Erba reagents, 1310-73-2, lote: OG049010L.
- Agua purificada tipo I con un sistema Millipore Direct-Q-3UV.

4. Absorción UV-VIS. Se empleó un espectrofotómetro de doble haz Cary 3Bio. Se emplearon los siguientes parámetros:

- Intervalo espectral de registro: de 250 nm (200 nm en el caso del **Grupo 1**) a 800 nm.
- Tiempo de integración: 0.10 s.
- Intervalo de lecturas: 1.00 nm.
- Velocidad de barrido: 600 nm/min.
- Anchura de rendija: 2 nm.
- Modo de registro: doble haz (durante las medidas se mantuvo una cubeta llena con el correspondiente disolvente en el haz de referencia).
- La corrección de la línea base se realizó siempre con dos cubetas llenas de disolvente, tanto en el compartimento de referencia como en el de la muestra.
- Sustracción del blanco. Se restó el blanco del disolvente correspondiente de cada cubeta para cada réplica de cada fluoróforo.

5. Fluorescencia en el estado estacionario. Se empleó un espectrofluorímetro Gilden Photonics “Fluorosens” con las siguientes especificaciones (en ningún momento se empleó ningún filtro o polarizador):

- Lámpara continua de arco de xenón de 150 W.
- Detector: Hamamatsu R1527.
- Fotodiodo de referencia: Hamamatsu UV100-L.
- Geometría de detección: 90°.
- Monocromadores en los canales de emisión y de excitación:
 - a) Red de difracción en la excitación: tallada @ 300 nm, 1200 líneas/mm. Eficiencia de pico >60%.
 - b) Red de difracción en la emisión: tallada @ 500 nm, 1200 líneas/mm. Eficiencia de pico >60%.

5.1.- *Parámetros empleados para el registro de los espectros de emisión.* Intervalo de lecturas: 1 nm; barrido simple; tiempo de integración: 200 ms.

Grupo 1: λ_{EXC} : 285 nm; Intervalo_{EM}: 290 – 560 nm; Rendija_{EM}: 2 nm; Rendija_{EXC}: 2 nm.

Comentario: El espectro de emisión de este grupo no pudo ser corregido porque el factor de corrección proporcionado por el fabricante solo cubría el rango espectral de emisión a $\lambda_{\text{EM}} \geq 350$ nm.

Grupo 2: λ_{EXC} : 355 nm; Intervalo_{EM}: 360 – 700 nm; Rendija_{EM}: 2 nm; Rendija_{EXC}: 2 nm.

Grupo 3: λ_{EXC} : 437 nm; Intervalo_{EM}: 445 – 850 nm; Rendija_{EM}: 2 nm; Rendija_{EXC}: 2 nm.

Comentarios: Para minimizar el ruido en el espectro del Ru(bpy)₃ (poco luminiscente en ACN), la banda de emisión sólo se integró entre 445 nm y 750 nm (en lugar de 445 - 850 nm). Se tomaron los valores de presión atmosférica y humedad debido a la sensibilidad del Ru(bpy)₃ a la presencia de oxígeno. **Presión atmosférica: 1010-1011 mbar**, 70-71% humedad.

Grupo 4: λ_{EXC} : 450 nm; Intervalo_{EM}: 460 – 850 nm; Rendija_{EM}: 3 nm; Rendija_{EXC}: 3 nm.

Grupo 5: λ_{EXC} : 499 nm; Intervalo_{EM}: 504 – 850 nm; Rendija_{EM}: 2 nm; Rendija_{EXC}: 2 nm.

Comentarios: Para minimizar el ruido en el espectro de la Eritrosina B (poco luminiscente en agua y metanol, el espectro de emisión solo se integró entre 504 nm y 740 nm (en lugar de 504 – 850 nm).

Grupo 6: λ_{EXC} : 535 nm; Intervalo_{EM}: 540 – 850 nm; Rendija_{EM}: 2 nm; Rendija_{EXC}: 2 nm.

Grupo 7: λ_{EXC} : 575 nm; Intervalo_{EM}: 580 – 850 nm; Rendija_{EM}: 2 nm; Rendija_{EXC}: 2 nm.

Grupo 8: λ_{EXC} : 600 nm; Intervalo_{EM}: 608 – 850 nm; Rendija_{EM}: 4 nm; Rendija_{EXC}: 4 nm.

4. RESULTADOS

En las siguientes figuras se muestran los espectros de absorción y emisión normalizados de todos los fluoróforos empleados para el estudio, indicando en el espectro absorción la longitud de onda donde se realizó la excitación tras ajustar las concentraciones para que todas las disoluciones mostraran un valor de absorbancia similar. En todos los espectros el color negro corresponde con el patrón.

Grupo 1

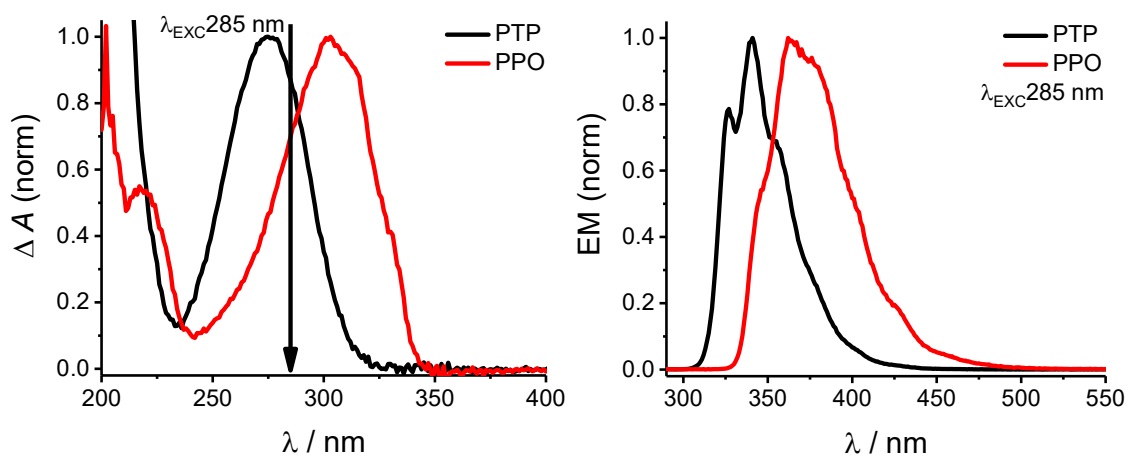
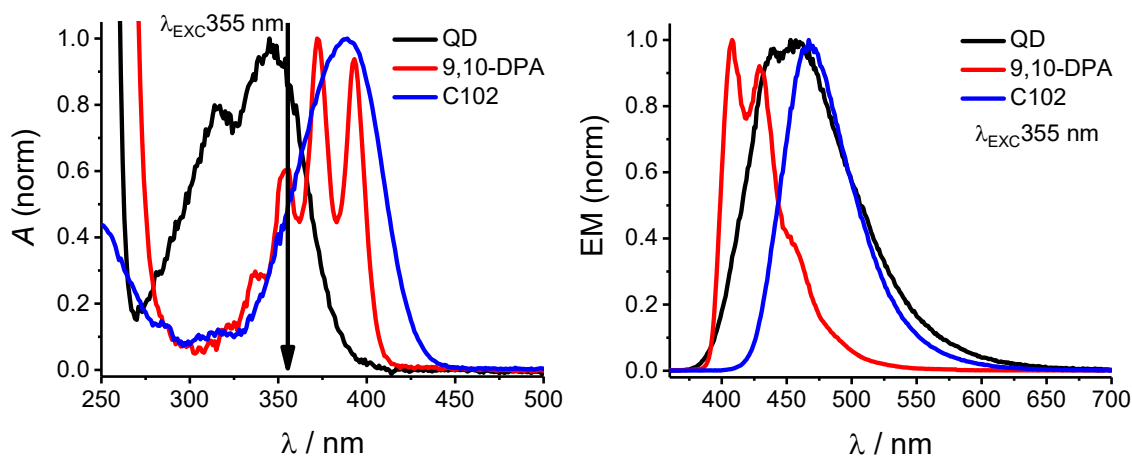
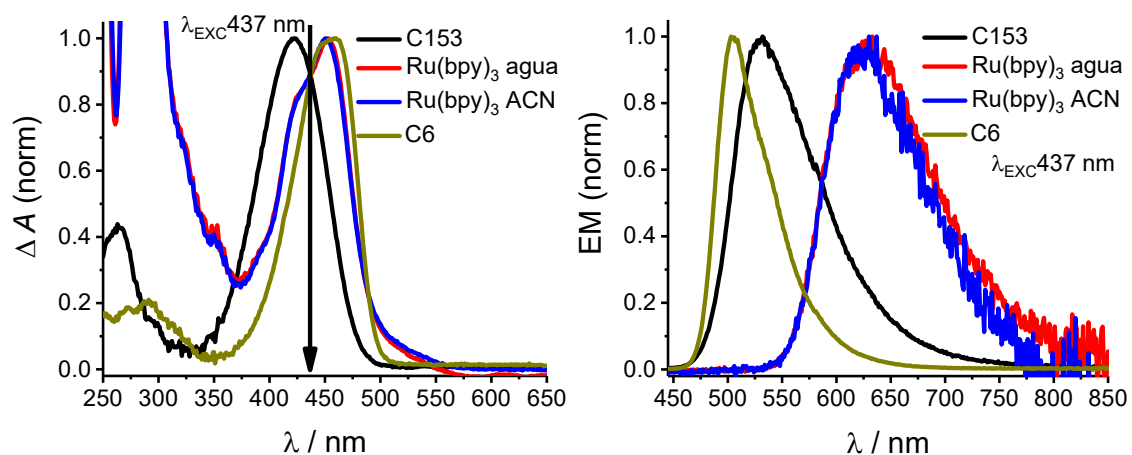


Figura 227. Espectros de absorción y emisión normalizados de los diferentes fluoróforos correspondientes al grupo 1 empleados para el estudio. El patrón de referencia aparece en color negro.

Grupo 2



Grupo 3



Grupo 4

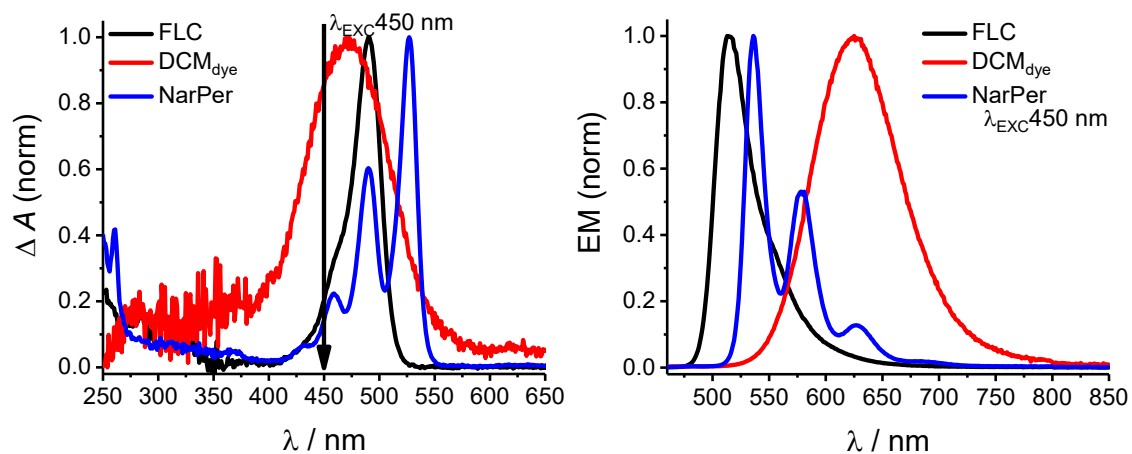
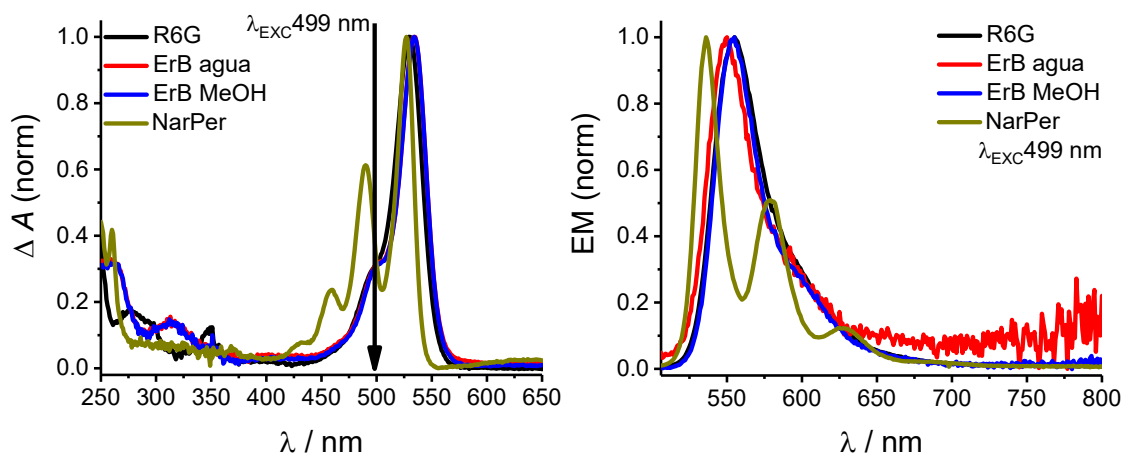
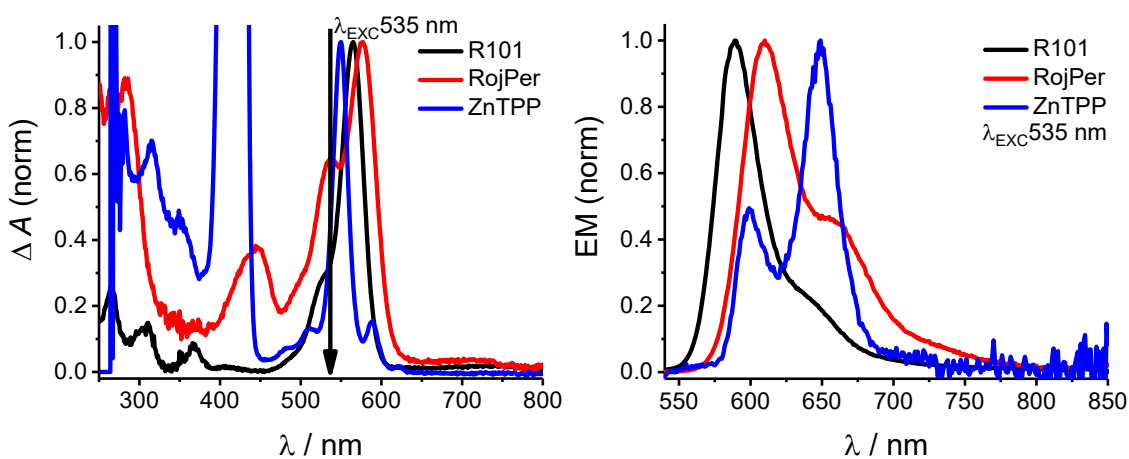


Figura 228. Espectros de absorción y emisión normalizados de los diferentes fluoróforos correspondientes a los grupos 2, 3 y 4 empleados para el estudio. Para todos ellos el patrón de referencia aparece en color negro.

Grupo 5



Grupo 6



Grupo 7

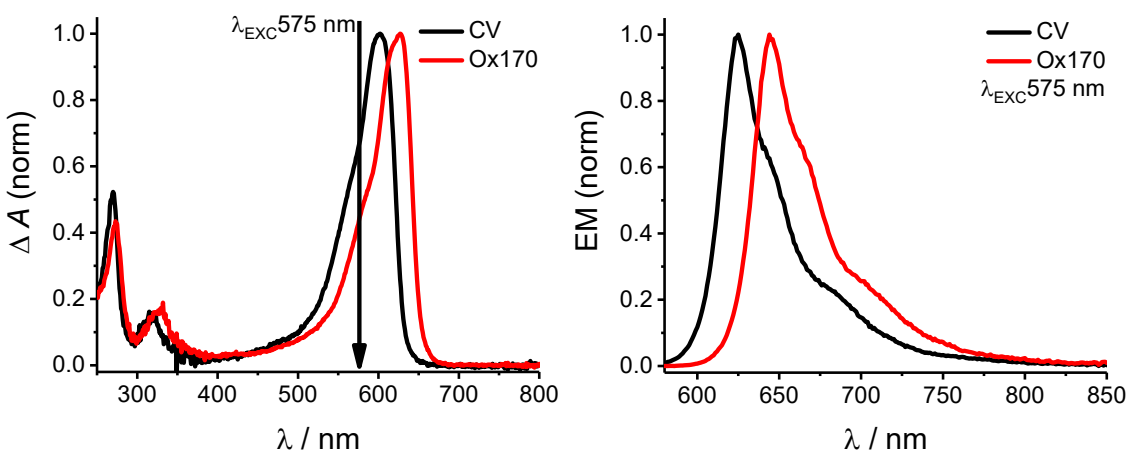


Figura 229. Espectros de absorción y emisión normalizados de los diferentes fluoróforos correspondientes a los grupos 5, 6 y 7 empleados para el estudio. Para todos ellos el patrón de referencia aparece en color negro.

Grupo 8

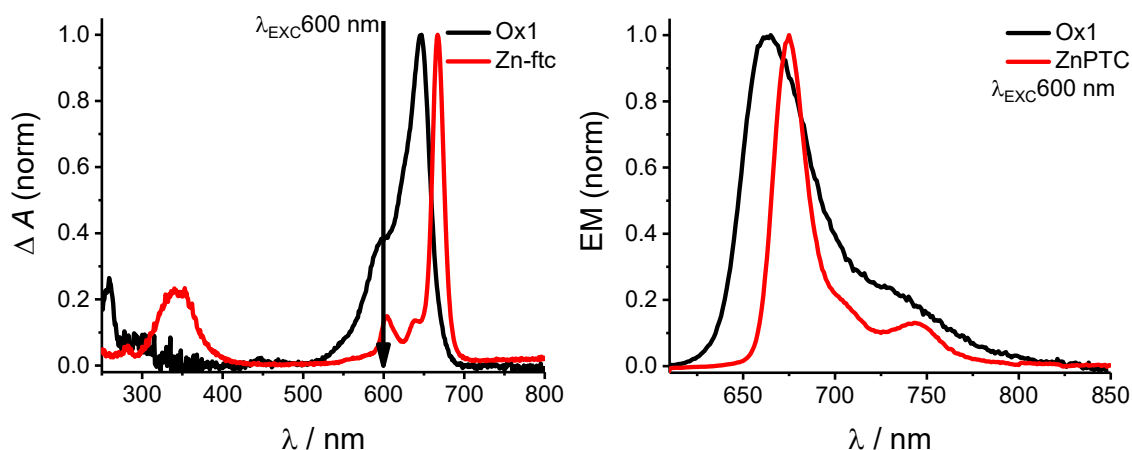


Figura 230. Espectros de absorción y emisión normalizados de los diferentes fluoróforos correspondientes al grupo 8 empleados para el estudio. El patrón de referencia aparece en color negro.

Una vez realizadas las diferentes medias y el tratamiento de los datos, se empleó la **ecuación A.2** para calcular el Φ_f de los diferentes fluoróforos. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**, junto con los valores de $\lambda_{\text{ABS}}^{\text{Max}}$ y $\lambda_{\text{EM}}^{\text{Max}}$ y el valor del rendimiento cuántico de fluorescencia descrito en bibliografía (Φ_f^{lit}). Para los patrones, este fue el valor que todos los grupos investigadores participantes emplearon en la **ecuación A.2** para calcular el resto de rendimientos cuánticos (**Tabla 13**, Φ_f^{exp}). En la tabla se muestra también, en forma de porcentaje, la desviación de la media experimental respecto al valor encontrado en la bibliografía (**Tabla 13**, $\text{RSD}(\%)_x$). Además, también se calculó el error total del método experimental (**Tabla 13**, $\text{RSD}(\%)_t$) como la suma de la RSD obtenido para la muestra y el obtenido para el estándar.

A excepción del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{\text{ACN}}$ y el ErB^{agua} , todas las medidas muestran un valor de $\text{RSD}(\%)_t$ inferior al 5%. Ambos compuestos poseen valores de Φ_f^{exp} muy bajos, con lo que las pequeñas desviaciones son mucho más significativas. Pese a que el valor $\text{RSD}(\%)_t$ obtenido en la medida del Φ_f del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{\text{ACN}}$ es relativamente importante, el valor de Φ_f^{exp} determinado se desvía en tan solo un 5% del valor referido en bibliografía. No ocurre lo mismo para el caso de la ErB^{agua} , cuyo valor de 0.0155 difiere un 30% del valor de 0.012 descrito en bibliografía. Se necesitarían más medidas para saber si este valor es erróneo o no, o poder compararlo con los resultados obtenidos por el resto de grupos de investigación (**Figura 231**).

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos para las determinaciones de Φ_f utilizando el método relativo, empleando 8 patrones y 12 fluoróforos. Φ_f^{lit} hace referencia a los valores de Φ_f descritos en la bibliografía y Φ_f^{exp} a los valores de Φ_f determinados experimentalmente.

	MUESTRA	λ_{ABS}^{Max} (NM)	λ_{EM}^{Max} (NM)	Φ_f^{lit}	Φ_f^{exp}	RSD(%) _T	RSD(%) _X
1	PTP	275	341	0.89 ± 0.01^{15}	0.890 ± 0.009	--	0
1	PPO	303	362	0.86^{15}	0.784 ± 0.018	3.30	9
2	QD	345	453	0.59 ± 0.04^1	0.590 ± 0.006	--	0
2	9,10-DPA	372	408	0.97 ± 0.03^{14}	0.625 ± 0.010	2.62	36
2	C102	389	467	0.764^2	0.619 ± 0.013	3.12	19
3	C153	422	532	0.53 ± 0.04^1	0.530 ± 0.007	--	0
3	Ru(bpy) ₃ ^{agua}	453	633	0.040 ± 0.002^{14}	0.038 ± 0.003	9.21	5
3	Ru(bpy) ₃ ^{ACN}	451	625	0.018 ± 0.002^{14}	0.0156 ± 0.0004	3.88	14
3	C6	460	504	0.78^{16}	0.805 ± 0.013	2.93	3
4	FLC	490	513	0.89 ± 0.04^1	0.89 ± 0.05	--	0
4	DCM _{dye}	471	625	0.435^2	0.408 ± 0.009	4.45	6
4	NarPer	527	536	0.99^9	0.91 ± 0.03	4.42	8
5	R6G	529	555	0.913^1	0.910 ± 0.016	--	0
5	NarPer	527	555	0.99^9	0.82 ± 0.02	4.2	17
5	ErB ^{agua}	527	550	0.012^{15}	0.0155 ± 0.0013	10.15	30
5	ErB ^{MeOH}	534	555	0.09^{15}	0.096 ± 0.003	4.88	7
6	R101	565	589	$0.91 \pm 0.05^{1-2}$	0.910 ± 0.012	--	0
6	RojPer	577	610	0.96^8	0.89 ± 0.03	4.69	7
6	ZnTPP	550	649	0.03^{11}	0.0270 ± 0.0007	3.91	12
7	CV	602	625	0.58 ± 0.03^2	0.578 ± 0.007	--	0
7	Ox170	625	644	0.579^2	0.574 ± 0.002	1.56	1
8	Ox1	647	665	0.148 ± 0.005^1	0.150 ± 0.005	--	0
8	ZnPTC	667	675	0.45^{11}	0.410 ± 0.007	5.04	9

Otros dos compuestos con valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia próximos a cero y cuyo valor obtenido difiere en más de un 10% del reportado en bibliografía son el Ru(bpy)₃^{agua} y la ZnTPP ambos con $\Phi_f \leq 0.03$. Además, hay que tener en cuenta que el Ru(bpy)₃ es muy sensible a la presencia de O₂ y que nuestro laboratorio se encuentra a 660 m sobre el nivel del mar.

El valor medio experimental obtenido para la 9,10-DPA es el que más se aleja del reportado en bibliografía (0.625 y 0.97¹⁴, respectivamente), siendo esta diferencia de un 36%. El espectro de absorción de la 9,10-DPA (**Figura 228, grupo 2**), que presenta 3 picos estrechos y de gran pendiente, puede introducir diferencias originadas por las distintas rendijas utilizadas en el registro de los espectros en uno y otro caso, ya que la ecuación de Parker-Rees contempla la corrección por un valor puntual del espectro de absorción, mientras que el espectro de emisión se obtiene a partir de la excitación en un intervalo de longitudes de onda. Quizá por ello, en la bibliografía podemos encontrar valores muy dispares para esta molécula, desde 0.70¹⁷ a 1.00.¹⁸ El caso del naranja de perileno sería similar al del 9,10-DPA. Este se ha medido en dos grupos diferentes obteniéndose valores muy dispares entre ellos (0.91 en la medida del grupo 4 y 0.82 en la del grupo 5), mientras que el reportado en bibliografía asciende a 0.99.⁹ Con estos resultados se puede concluir que la utilización como patrones de fluoróforos cuyo espectro de absorción presente estructura fina (vibrónica) debería evitarse.

Finalmente, para la cumarina 102, se obtuvo una diferencia del 19% entre los valores Φ_f experimental y el de la bibliografía. La C102 presenta un espectro de absorción con solo un pico y este es bastante ancho; además, no se han descrito ni se observaron durante la medida problemas de estabilidad. Por ello, esta gran diferencia no es atribuible a ningún factor salvo a errores experimentales lo que sólo podría confirmarse mediante los valores determinados por el resto de grupos participantes en el estudio.

Pese a no disponer de los resultados numéricos, para poder profundizar más en la discusión, sí se dispone de la **Figura 231** extraída del poster presentado por el Prof. Fred Brouwer (Univ. de Amsterdam) en el XXVI Congreso de Fotoquímica de la IUPAC (Osaka, 3-8 Abril de 2016).

Los resultados de los diferentes laboratorios mostraron una variación sorprendentemente grande, aunque la reproducibilidad dentro de cada laboratorio a menudo fuese buena. Un error del $\pm 10\%$ en un rendimiento cuántico debe considerarse normal utilizando el método relativo. Para los compuestos con Φ_f bajos, como la EryB y el Ru(bpy)₃, los errores relativos y la dispersión de los resultados fue mucho mayor. De nuevo para el Ru(bpy)₃ se debería de tener en cuenta la diferente concentración de oxígeno en los laboratorios participantes. Para la 9,10-DPA los valores obtenidos varían desde 0.6 a 0.8 pero no llegan en ningún caso al 0.97 reportado, encontrándose el 0.625 obtenido en dicho intervalo. Finalmente, se observa claramente que el valor obtenido en esta Tesis para la C102 (0.619) está por debajo del intervalo donde se encuentran el resto de los valores proporcionados por los demás laboratorios (aprox. 0.7 – 0.9).

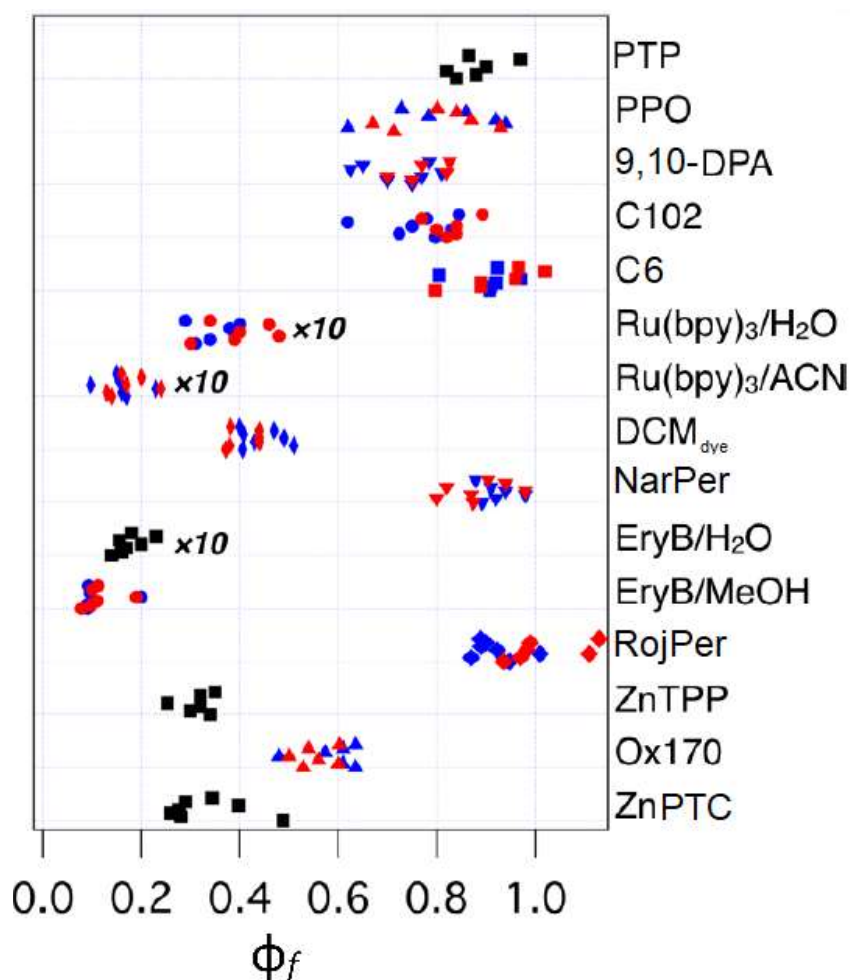


Figura 231. Resumen de los resultados obtenidos por los diferentes grupos participantes en el proyecto IUPAC “Measurement of Photoluminescence Quantum Yields”, de las determinaciones de Φ_f de fluoróforos seleccionados utilizando el método relativo. Se emplearon 8 estándares y 12 fluoróforos diferentes. En rojo y azul se representan los valores obtenidos para los fluoróforos cuándo se midieron con dos referencias diferentes, siendo en rojo el valor obtenido con la referencia cuya emisión era a longitudes de onda menores, y en azul con la referencia cuya emisión era a longitudes de onda mayores. Imagen extraída del poster “IUPAC Project Measurement of Photoluminescence Quantum Yields” presentado por el Prof. Fred Brouwer en el XXVI Congreso de Fotoquímica de la IUPAC (Osaka, 3-8 Abril de 2016).

En conclusión, el método relativo o de Parker-Rees resulta un método sencillo y de bajo coste, pero se debe de emplear con cuidado y ciertas precauciones. De otro modo, este método puede llegar a presentar una importante inexactitud de los resultados, normalmente aceptables y menores a un 10%, pero que en compuestos con rendimientos de fluorescencia bajos puede llegar a superar el 20%.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U., Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples, *Nat. Protoc.*, **2013**, 8, 1535.
2. Rurack, K.; Spieles, M., Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600–1000 nm, *Anal. Chem.*, **2011**, 83 (4), 1232-1242.
3. Brouwer Albert, M., Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **2011**, 83, 2213.
4. Parker, C. A.; Rees, W. T., Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency, *Analyst*, **1960**, 85 (1013), 587-600.
5. Rurack, K., Fluorescence quantum yields: methods of determination and standards. In *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I: Techniques*, Resch-Genger, U., Ed., *Springer*: Germany, **2008**, 101-145.
6. Galanin, M. D.; Kutyonkov, A. A.; Smorchkov, V. N.; Timofeev, Y. P.; Chizhikova, Z. A., Measurement of photo-luminescence quantum yield of dye solutions by the vavilov and integrating-sphere methods, *Opt. Spektrosk.*, **1982**, 53 (4), 683-690.
7. Bindhu, C. V.; Harilal, S. S., Effect of the excitation source on the quantum-yield measurements of rhodamine B laser dye studied using thermal-lens technique, *Anal. Sci.*, **2001**, 17 (1), 141-144.
8. Seybold, G.; Wagenblast, G., New perylene and violanthrone dyestuffs for fluorescent collectors, *Dyes Pigment.*, **1989**, 11 (4), 303-317.
9. Ford, W. E.; Kamat, P. V., Photochemistry of 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic dianhydride dyes. 3. Singlet and triplet excited-state properties of the bis(2,5-di-tert-butylphenyl)imide derivative, *J. Phys. Chem.*, **1987**, 91 (25), 6373-6380.
10. Seybold, P. G.; Gouterman, M., Porphyrins: XIII: fluorescence spectra and quantum yields, *J. Mol. Spectrosc.*, **1969**, 31 (1), 1-13.
11. Gradyushko, A. T.; Sevchenko, A. N.; Solovyov, K. N.; Tsvirko, M. P., Energetics of photochemical processes in chlorophyll-like molecules, *Photochem. Photobio.*, **1970**, 11 (6), 387-400.
12. Resch-Genger, U.; Hoffmann, K.; Nietfeld, W.; Engel, A.; Neukammer, J.; Nitschke, R.; Ebert, B.; Macdonald, R., How to improve quality assurance in fluorometry: fluorescence-inherent sources of error and suited fluorescence standards, *J. Fluoresc.*, **2005**, 15 (3), 337-362.
13. Horiba https://www.mrfn.org/sites/mrfn.org/files/instrument/Quanta-phi_Integrating_Sphere_Manual_0.pdf. (último acceso enero 2019).

14. Suzuki, K.; Kobayashi, A.; Kaneko, S.; Takehira, K.; Yoshihara, T.; Ishida, H.; Shiina, Y.; Oishi, S.; Tobita, S., Reevaluation of absolute luminescence quantum yields of standard solutions using a spectrometer with an integrating sphere and a back-thinned CCD detector, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11* (42), 9850-9860.
15. Boens, N.; Qin, W.; Basarić, N.; Hofkens, J.; Ameloot, M.; Pouget, J.; Lefèvre, J.-P.; Valeur, B.; Gratton, E.; vandeVen, M.; Silva, N. D.; Engelborghs, Y.; Willaert, K.; Sillen, A.; Rumbles, G.; Phillips, D.; Visser, A. J. W. G.; van Hoek, A.; Lakowicz, J. R.; Malak, H.; Gryczynski, I.; Szabo, A. G.; Krajcarski, D. T.; Tamai, N.; Miura, A., Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy, *Anal. Chem.*, **2007**, *79* (5), 2137-2149.
16. Reynolds, G. A.; Drexhage, K. H., New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers, *Opt. Commun.*, **1975**, *13* (3), 222-225.
17. Meech, S. R.; Phillips, D., Photophysics of some common fluorescence standards, *J. Photoche.*, **1983**, *23* (2), 193-217.
18. Williams, A. T. R.; Winfield, S. A.; Miller, J. N., Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer, *Analyst*, **1983**, *108* (1290), 1067-1071.

ORGULLO FOTOQUÍMICO*



El año 2015 fue elegido por la UNESCO como el año internacional de la luz. La importancia de esta no se limita simplemente a iluminar nuestras vidas sino que toda la tecnología asociada a ella juega un papel sumamente importante en el mundo actual en áreas tan diversas como la energía, la educación, la salud o la comunicación.

El grupo de investigación GSOLFA de la UCM basa gran parte de su investigación en el desarrollo de sensores luminiscentes utilizando fluoróforos.

Un fluoróforo es una molécula o parte de una molécula capaz de absorber luz a una determinada longitud de onda y por tanto con una determinada energía, esta energía es empleada por el fluoróforo para pasar a un estado excitado desde el cual la molécula se relaja emitiendo luz con una longitud de onda de menor energía a la absorbida inicialmente.

En esta imagen vemos una gran variedad de fluoróforos que abarcan todas las longitudes de onda del espectro visible formando la bandera del colectivo LGTB+, con esto queremos reivindicar una química sostenible en todos los sentidos, libre de discriminación sexual, género, etnia, religión y/o ideología, aún tan necesaria en estos tiempos.

*Fotografía con la que se participó en el VIII Concurso de Divulgación Científica organizado por Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la UCM en 2018. Trabajo realizado junto con la Lcda. Idoia Urriza.

